

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE ANATOMÍA PATOLÓGICA



TESIS DOCTORAL

**Modulación mediante preconditionamiento isquémico de la
respuesta inflamatoria y apoptótica inducida por isquemia-
reperfusión en un modelo experimental porcino de
autotrasplante pulmonar**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

Sara Zapatero García

DIRECTORES

Emilio Álvarez Fernández
María Cebollero Presmanes
Carlos María Simón Adiego

Madrid, 2018

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Anatomía Patológica



**MODULACIÓN MEDIANTE PRECONDICIONAMIENTO ISQUÉMICO DE LA
RESPUESTA INFLAMATORIA Y APOPTÓTICA INDUCIDA POR ISQUEMIA-
REPERFUSIÓN EN UN MODELO EXPERIMENTAL PORCINO DE
AUTOTRASPLANTE PULMONAR**

TESIS DOCTORAL

Sara Zapatero García

Madrid, 2017

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Programa de Doctorado en Investigación
Biomédica

Departamento de Anatomía Patológica



**MODULACIÓN MEDIANTE PRECONDICIONAMIENTO ISQUÉMICO DE LA
RESPUESTA INFLAMATORIA Y APOPTÓTICA INDUCIDA POR ISQUEMIA-
REPERFUSIÓN EN UN MODELO EXPERIMENTAL PORCINO DE
AUTOTRASPLANTE PULMONAR**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR PRESENTADA POR:

Sara Zapatero García

BAJO LA DIRECCIÓN DE LOS DOCTORES:

Emilio Álvarez Fernández
María Cebollero Presmanes
Carlos María Simón Adiego

Madrid, 2017

***Dedicado a mis padres,
porque todo lo que soy,
se lo debo a ellos.***

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi más sincero agradecimiento a todas las personas que han colaborado para hacer posible la realización de este proyecto.

En primer lugar, quiero transmitir mi agradecimiento al Doctor Emilio Álvarez Fernández, director principal de esta tesis doctoral, Profesor emérito de Anatomía Patológica de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid. Como jefe del Departamento de Anatomía Patológica del Hospital General Universitario Gregorio Marañón, en el momento en el que se inició este trabajo, me ofreció la posibilidad de realizar este proyecto bajo su tutela científica, y ha guiado mis pasos en el desarrollo del mismo.

A la Doctora María Cebollero Presmanes, médico adjunto del Departamento de Anatomía Patológica del Hospital General Universitario Gregorio Marañón y profesora asociada de la Universidad Complutense de Madrid, directora de esta tesis doctoral. Quiero manifestarle mi agradecimiento por su apoyo y valiosa colaboración en el desarrollo de este proyecto.

Al Doctor Carlos Simón Adiego, médico adjunto de Cirugía Torácica del Hospital Gregorio Marañón, profesor asociado de la Universidad Complutense de Madrid, director de esta tesis doctoral. Realmente no tengo suficientes palabras para poder agradecer su inestimable ayuda, su inagotable capacidad de trabajo y dedicación, su apoyo tanto científico como emocional, por su infinita paciencia, por obligarme a dar más de mí, y por enseñarme el valor de la perseverancia y la constancia. Sin él, este proyecto no hubiera existido.

Quisiera agradecer al Profesor Francisco Javier Carricondo Orejana, Profesor contratado Doctor del Departamento de Neurobiología de la Audición de la Universidad Complutense de Madrid y a sus colaboradoras Bárbara Romero Gómez, profesora asociada, y Encarnación Muñoz Ferrero, técnico, por poner a nuestra disposición su laboratorio, su tiempo, y sus valiosos consejos y conocimientos científicos.

A Doctor Ignacio Garutti Martínez, médico adjunto de Anestesia y Reanimación del Hospital General Universitario Gregorio Marañón y profesor asociado de la Universidad Complutense de Madrid, por haber contado conmigo para la realización de este proyecto, por sus sabios consejos y su inestimable ayuda en la realización de esta tesis doctoral.

Al personal técnico del Departamento de Anatomía Patológica del Hospital Gregorio Marañón, en especial a Marisa Herranz Aladro y Julio García Bordás.

Quiero agradecer a todos los colaboradores pertenecientes al servicio de Anestesiología y Reanimación, y Cirugía Torácica, así como del personal de la Unidad de Medicina y Cirugía Experimental del Hospital General Universitario Gregorio Marañón, que han hecho posible la realización de éste experimento.

A la Doctora Elena Varas Almeigeira, Catedrática del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid.

A Andrea Romera Rabasa y Uxío García-Aldao, porque una de las mejores cosas que me ha aportado la realización de esta tesis doctoral, es haber tenido la

oportunidad de compartirlo con personas como vosotros, que habéis sido un grandísimo apoyo para mí, tanto emocional como profesional. Muchas gracias, amigos.

A mis padres, que son mi ejemplo a seguir y me lo han dado todo. Gracias a ellos he podido realizarme como profesional y como persona, y me siguen ayudando y respaldando incondicionalmente cada día.

A toda mi familia, que es un pilar fundamental en mi vida.

Por último, quiero agradecerle de corazón a mi marido Jacobo, su amor y su apoyo en todo lo que hago, por estar siempre a mi lado a pesar de las dificultades, por ser mi compañero, mi mejor amigo, mi amor.

LISTA DE ABREVIATURAS:

ADP: Adenosina-difosfato

Ag: antígeno

Apaf-1: del inglés: apoptosis protease activating factor-1

ATP: adenosina-trifosfato

Bad: del inglés: Bcl-2-associated death promoter

BAS: basal

Bax: regulador de apoptosis BAX

Bcl-2: del inglés: B cell lymphoma 2

Bcl-X_L: del inglés: B-cell lymphoma extra large

CO₂: dióxido de carbono

CON: grupo control

DNA: ácido desoxirribonucleico

ECG: electrocardiograma

FC: frecuencia cardíaca.

GC: gasto cardíaco.

H₂O₂: peróxido de hidrógeno.

HE: hematoxilina-eosina

I.V: intravenoso

IC: índice cardíaco

ICAM-1: del inglés: intercellular adhesion molecule-1

IFN- γ : interferon gamma

IHQ: inmunohistoquímica

IL-1: interleuquina 1

IL-4: interleuquina 4

IL-6: interleuquina 6

IL-8: interleuquina 8

IL-10: interleuquina 10

IL-12: interleuquina 12

IL-18: interleuquina 18

IR: isquemia-reperfusión

K_{ATP}: Canales de potasio ATP dependientes

LPO: lipoperoxidación

MA: macrófago alveolar

MCP-1: proteína quimiotáctica de monocitos 1

MDA: malóndialdehído

NADPH: oxidasa nicotinamida adenina dinucleótido

NF- κ B: factor nuclear potenciador de las cadenas kappa de las células B
activadas

NO: óxido nítrico

NOS: óxido nítrico sintasa

O₂: oxígeno

PaCO₂: presión parcial arterial de dióxido de carbono

PAM: presión arterial media

PaO₂: presión parcial arterial de oxígeno

PAP: presión arteria pulmonar

PAPM: presión media de la arteria pulmonar

PARP: Poli ADP ribosa polimerasa

PCI: preconditionamiento isquémico

PCP: presión capilar pulmonar

PMN: polimorfonucleares

PR-Re: pre reperusión

Rep-30: 30 minutos post reperusión

RLO: radicales libres de oxígeno

RNA: ácido ribonucleico

SDRA: síndrome de distres respiratorio del adulto

SHAM: grupo de cirugía simulada

SIR: síndrome isquemia-reperusión

SIRS: síndrome de respuesta inflamatoria sistémica

SOD: Superóxido dismutasa

TNF- α : factor de necrosis tumoral alfa

TUNEL: del inglés: terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling

VCAM-1: del inglés: vascular cell adhesion molecule-1

INDICE

RESUMEN/SUMMARY	1
Resumen.....	2
Summary	6
INTRODUCCIÓN	10
Síndrome isquemia-reperfusión	11
1. Historia.....	11
2. Importancia	12
3. Fisiopatología	12
Síndrome de isquemia-reperfusión pulmonar.....	14
1. Importancia	14
2. Fisiopatología	15
2.1. Respuesta inflamatoria	16
2.2. Muerte celular	24
Prevención del daño pulmonar por isquemia-reperfusión	30
Precondicionamiento isquémico.....	32
1. Historia.....	32
2. Mecanismos.....	32
Precondicionamiento isquémico sobre el pulmón	36
1. Modelos animales.....	36
2. Efectos del precondicionamiento isquémico pulmonar.....	37
Justificación del proyecto.....	39

HIPOTESIS Y OBJETIVOS	41
1. Hipótesis.....	42
2. Objetivos.....	43
MATERIAL Y MÉTODOS:	46
Resumen del experimento	47
Material y métodos	48
1. Material	48
1.1. Material biológico: Animales	48
1.2. Características de los quirófanos y material quirúrgico	49
2. Protocolo anestésico	50
3. Protocolo quirúrgico	52
4. Instalaciones	54
5. Diseño experimental	55
5.1. Mediciones y toma de muestras	56
5.2. Variables gasométricas	57
5.3. Variables hemodinámicas	57
5.4. Obtención de muestras de tejido pulmonar y procesamiento.....	58
5.5. Análisis de los datos y tratamiento estadístico	67
RESULTADOS.....	68
Variables generales.....	69
Resultados gasométricos.....	70
Resultados hemodinámicos	71
Resultados histopatológicos (tinción hematoxilina-eosina).....	73

1. Estudio descriptivo	73
2. Análisis estadístico hematoxilina-eosina	79
Resultados inmunohistoquímicos	86
1. Tinción inmunohistoquímica con CD68	86
1.1. Estudio descriptivo	86
1.2. Estudio analítico	91
2. Tinción inmunohistoquímica para MCP-1.....	92
2.1. Estudio descriptivo.....	92
2.2. Estudio analítico	96
3. Determinación inmunohistoquímica de Caspasa-9.....	97
3.1. Estudio descriptivo	97
3.2. Estudio analítico.....	101
4. Determinación inmunohistoquímica de Bcl-2.....	102
4.1. Estudio descriptivo.....	102
4.2. Estudio analítico	105
DISCUSIÓN.....	108
BIBLIOGRAFÍA	135

RESUMEN/SUMMARY

RESUMEN

INTRODUCCIÓN

En diversas situaciones clínicas y quirúrgicas, cada vez más frecuentes en la actualidad, el pulmón se ve sometido a períodos de isquemia más o menos prolongados con el consiguiente riesgo de producirse un síndrome de isquemia-reperfusión (SIR). Este síndrome, implica una compleja reacción inflamatoria que cursa con una disrupción de las barreras endoteliales y epiteliales, dando lugar a edema pulmonar grave y disfunción pulmonar, que aumenta la morbilidad temprana postquirúrgica. Debido sus importantes consecuencias, es de gran interés el desarrollo de métodos de protección pulmonar frente al SIR.

El preconditionamiento isquémico (PCI) es un método por el cual se somete a un órgano a uno o varios períodos breves de isquemia, previo a una agresión isquémica mayor, con el fin de reducir la extensión del daño por isquemia-reperfusión. Existe poca evidencia científica de los efectos del PCI sobre el SIR pulmonar, pero ha demostrado su efecto protector en varios modelos experimentales animales.

HIPOTESIS Y OBJETIVOS

Nos planteamos como hipótesis, que el PCI sobre el pulmón podría ejercer un efecto protector precoz sobre SIR, y que ésta protección puede ponerse de manifiesto en el tejido pulmonar mediante técnicas histológicas e inmunohistoquímicas (IHQ). Para intentar demostrar la hipótesis planteada, se

diseñó un modelo de autotrasplante pulmonar en cerdo para el estudio del tejido pulmonar sometido a una isquemia prolongada y un breve periodo de reperfusión (30 minutos). La realización de maniobras de PCI permite valorar, como objetivo principal de este estudio, los efectos protectores sobre el SIR pulmonar. Los objetivos específicos fueron la realización de un análisis histológico del daño pulmonar (mediante tinción con hematoxilina-eosina) y análisis de expresión inmunohistoquímica de CD68 (para identificar la implicación de células de estirpe monocito-macrófago), proteína quimiotáctica de monocitos-1 (MCP-1) y proteínas relacionadas con la apoptosis como son la caspasa-9 y la proteína Bcl-2, y analizar los efectos del PCI sobre ellos.

MATERIAL Y MÉTODOS

El protocolo quirúrgico consiste en la realización de una neumonectomía izquierda, lobectomía craneal *ex-situ*, reimplantación del lóbulo caudal y reperfusión del mismo durante 30 minutos. Se realizaron 16 procedimientos quirúrgicos divididos en 3 grupos: grupo control (CON), grupo de preconditionamiento isquémico (PCI) y grupo de cirugía simulada (SHAM). En el grupo PCI, antes de finalizar la neumonectomía, se realiza oclusión de la arteria pulmonar izquierda, durante dos periodos de cinco minutos, intercalando cinco minutos de reperfusión entre ellos. Al grupo de animales del grupo SHAM, se les realizó exclusivamente una toracotomía. Se realizan determinaciones gasométricas arteriales y hemodinámicas, así como biopsias de tejido pulmonar a los 30 minutos de la reperfusión para tinción con hematoxilina-eosina y determinación inmunohistoquímica de CD68, MCP-1, caspasa-9 y Bcl-2.

El estudio analítico de las variables se realiza mediante test no paramétricos. Las variables cuantitativas se presentan como media y error típico y las variables semicuantitativas y cualitativas se presentan con sus frecuencias y porcentajes. La hipótesis nula fue rechazada para un valor de $\alpha=0,05$.

RESULTADOS:

No se encuentran diferencias destacables de las variables gasométricas y hemodinámica entre grupos.

La IR produjo en el tejido pulmonar una reacción inflamatoria (CON vs SHAM, $p=0,018$), con predominio de células macrofágicas (CON vs SHAM, $p=0,012$). En el grupo sometido a PCI se observa una menor inflamación (PCI vs CON $p=0,03$) e infiltrado por macrófagos (PCI vs CON $p=0,018$). Tras la IR observamos un aumento de expresión de células CD68+ (CON vs SHAM, $p=0,011$), y en el grupo PCI, aunque también aumentan, lo hacen en menor medida que en el grupo control (CON vs PCI, $p=0,06$). La IR produjo en el tejido pulmonar un aumento de expresión de MCP-1 (CON vs SHAM, $p=0,027$), pero al aplicar PCI, disminuye su expresión (CON vs PCI, $p=0,017$). La IR indujo en los pulmones un aumento caspasa-9 ($P=0,09$ CON vs SHAM) y en el grupo PCI disminuye la caspasa-9 con respecto al grupo control ($p=0,06$ PCI vs CON). El PCI indujo un aumento de expresión de la proteína Bcl-2 en las células pulmonares, con respecto al grupo sometido a IR (CON vs PCI, $p=0,044$) y el grupo SHAM (PCI vs SHAM, $p=0,047$).

CONCLUSIONES:

En nuestro modelo, se demuestra la modulación de la fase temprana del SIR pulmonar, mediante PCI. Esta protección se manifiesta en los tejidos a los 30 minutos de la reperusión, tanto en el análisis histológico como mediante técnicas inmunohistoquímicas. Se demuestra una reducción del infiltrado inflamatorio de predominio macrofágico causado por IR pulmonar, que se confirma por una disminución de células CD68+ en el tejido. Así mismo, cuando se aplica PCI, existe una disminución de MCP-1, que es un mediador responsable de la quimiotaxis de monocitos y macrofagos. Además, el PCI ha mostrado disminuir la caspasa-9 y aumentar la proteína antiapoptótica Bcl-2 en tejidos preconditionados, que se traduce como una disminución de la apoptosis.

El PCI ejerce un efecto protector del SIR pulmonar disminuyendo la inflamación y apoptosis en el tejido a los 30 minutos de la reperusión.

SUMMARY

INTRODUCTION

Some clinical and surgical procedures widely used nowadays involve inducing lung ischemia for extended periods of time, with the risk of developing lung ischemia-reperfusion injury (LIRI). This syndrome involves a complex inflammatory response that causes disruption of epithelial and endothelial barriers and leads to severe pulmonary edema and lung dysfunction, thus increasing early postoperative morbidity and mortality. Given its important consequences, there is a growing interest in developing methods to protect the lung from developing LIRI. Ischemic preconditioning (IP) is a method that uses short periods of ischemia on one or more organs prior to prolonged ischemia in order to reduce the extension of the damage caused by IR. There is little evidence of the effect of IP on LIRI. However, its protective effect has been proven on some experimental animal models.

HYPOTHESIS AND OBJECTIVES:

Our hypothesis was that IP could have a protective effect on lung IRI, and it could be demonstrated on lung tissue by means of histologic and immunohistochemical techniques. In order to prove our hypothesis, we designed a lung autotransplantation model on pigs to evaluate lung tissue exposed to prolonged ischemia and a subsequent short-period reperfusion (30 minutes). The primary aim of this study was to evaluate the protective effect of IP maneuvers on lung IRI. The specific aims were to analyze histologic lung-tissue injury (using hematoxylin-eosin staining) and immunohistochemical expression of CD68 (to

identify the recruitment of cells of a monocyte/macrophage lineage), monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) and apoptosis-related proteins such as caspase-9 and Bcl-2, as well as to evaluate how IP affects them.

MATERIAL AND METHODS:

The surgical protocol consisted in left pneumonectomy, *ex situ* cranial lobectomy, left caudal lobe reimplantation and a 30-minute graft reperfusion. We performed 16 surgical procedures divided into 3 groups: control group (CON), ischemic preconditioning group (IP) and simulated surgery group (SHAM). In the IP group, left pulmonary artery was clamped before finishing pneumonectomy during two 5-minute periods, with a 5-minute interval reperfusion between them. In the SHAM group, only a thoracotomy was performed. We carried out arterial blood-gas and hemodynamic measurements, together with lung-tissue biopsies 30 minutes after reperfusion for hematosilin-eosin staining and immunohistochemical evaluation of CD68, MCP-1, caspase-9 and Bcl-2 expression. The statistical analysis was made using non-parametric tests. Mean and standard error were used for quantitative variables, and frequency and percentages for semiquantitative variables. Null hypothesis was rejected for $\alpha=0,05$.

RESULTS:

There were no remarkable differences in gasometric or hemodynamic variables among groups. Ischemia-reperfusion (IR) caused an inflammatory response in lung tissue (CON vs. SHAM, $p=0,018$), with macrophage cell predominance (CON

vs. SHAM, $p=0,012$). In the IP group there was less inflammatory response (IP vs. CON, $p=0,03$) and less macrophage cell infiltration (IP vs. CON $p=0,018$). After IR, we observed a higher expression of CD68+ cells (CON vs. SHAM, $p=0,011$), which was also seen in the IP group, although less than in the control group (CON vs. IP, $p=0,06$). IR caused an increased expression of MCP-1 (CON vs. SHAM, $p=0,027$), being it reduced after IP (CON vs. IP, $p=0,017$). IR also induced an increased expression of caspase-9 on lung tissue (CON vs. SHAM, $p=0,09$), but it was reduced in the IP group compared to the control group (IP vs. CON, $p=0,06$). IP induced an increased expression of Bcl-2 in pulmonary cells compared to the IR group (CON vs. IP, $p=0,044$) and the SHAM group (IP vs. SHAM, $p=0,047$).

CONCLUSIONS:

Our model demonstrates early phase modulation of LIRI by means of IP. This protective effect is seen on tissue samples 30 minutes after reperfusion, both in histological and immunohistochemical analysis. A reduction in the macrophage-predominant inflammatory infiltrate caused by IP is confirmed by a reduction in CD68+ cells in lung tissues. Moreover, expression of MCP-1, which is a mediator of monocyte/macrophage chemotaxis, is lower when IP is performed. IP also diminished the expression of caspase-9 and increased that of anti-apoptotic protein Bcl-2, which results in a reduction of the apoptotic response. IP has a protective effect on LIRI, reducing inflammation and apoptosis in lung tissue 30 minutes after reperfusion.

INTRODUCCIÓN

SÍNDROME ISQUEMIA-REPERFUSIÓN

1. HISTORIA

El Síndrome de ischemia-reperfusión (SIR) es un mecanismo de lesión tisular que se produce al restablecer el flujo sanguíneo a un órgano sometido previamente a un período de ischemia. Fue descrito en los años 70 por Haimovici (1) con el nombre de *síndrome metabólico-mionefrótico*. Se vio que en casos de ischemia arterial aguda de un miembro inferior se diferenciaban dos fases: la isquémica y la revascularización y, aunque en la fase isquémica ya había manifestaciones sistémicas, el impacto clínico y metabólico tras la revascularización era más severo y determinante para la supervivencia del paciente. Sus alarmantes consecuencias llevaron a Parks y Granger (2) a estudiar las lesiones tisulares derivadas de la reperfusión. Ellos analizaron los cambios histológicos en intestinos de felino detectando mayor afectación tisular (pérdida de grosor de la mucosa intestinal) en los especímenes sometidos a 3h de ischemia seguida de 1h de reperfusión que los observados en 4h de ischemia sola. Finalmente fue llamado SIR al daño celular tras la reperfusión de tejidos isquémicos previamente viables (3).

2. IMPORTANCIA

El conocimiento de los mecanismos del daño por isquemia reperusión (IR) es de gran interés en la práctica clínica, ya que participa en situaciones frecuentes como el infarto agudo de miocardio, terapias trombolíticas, angioplastias, accidentes cerebrovasculares, traumatismos, quemaduras, cirugías mayores, shock de origen diverso y trasplantes de órganos (4).

3. FISIOPATOLOGÍA

El SIR comprende de dos mecanismos de daño celular que se potencian mutuamente: la isquemia y la reperusión. A consecuencia de los mismos, se desarrollan cronológicamente una serie de lesiones que, en función de su reversibilidad, van a hacer que el órgano tenga o no posterior viabilidad funcional.

Durante la **fase isquémica** existe una limitación del flujo sanguíneo y se producen consecuencias de la falta de oxígeno y nutrientes (anoxia, alteración del metabolismo celular, acumulación de metabolitos tóxicos, acidosis...) (4) que pueden conducir a la muerte celular. Cada órgano o tejido tiene una sensibilidad y resistencia a la isquemia, que varía desde pocos minutos en caso del cerebro, a horas en caso del sistema músculo-esquelético. Con la **reperusión**, se restablece el flujo sanguíneo y la oxigenación. Múltiples factores intervienen en daño tisular asociado a esta fase, entre los que destaca un importante estrés oxidativo, disfunción endotelial y una respuesta inflamatoria mediada por citoquinas, factores quimiotácticos, complemento, eicosanoides e infiltración leucocitaria (5).

El SIR no sólo afecta al órgano sometido a la isquemia (respuesta local), sino también a órganos a distancia (respuesta sistémica) por liberación de mediadores al torrente sanguíneo, produciéndose acidosis metabólica, hipercaliemia, mioglobinuria y daño a distintos órganos. Si es lo suficientemente severa, la respuesta inflamatoria puede conducir a un síndrome de respuesta inflamatoria sistémica que supone un 30-40% de la mortalidad en unidades de cuidados intensivos (4).

SÍNDROME DE ISQUEMIA-REPERFUSIÓN PULMONAR:

1. IMPORTANCIA

En diversas situaciones clínicas el pulmón se ve sometido a períodos de isquemia más o menos prolongados con el consiguiente riesgo de daño pulmonar por IR, como son la angioplastia de la arteria pulmonar, la cirugías complejas, la trombolisis después de un embolismo pulmonar masivo, el by-pass cardiopulmonar y el trasplante pulmonar.

El SIR pulmonar se caracteriza por daño alveolar inespecífico, edema pulmonar no cardiogénico, aumento de las resistencias vasculares pulmonares, alteración de la oxigenación y disminución de la complianza (6), pudiendo producirse en casos graves un síndrome de distres respiratorio del adulto. El SIR pulmonar sigue siendo la primera causa de fallo agudo del injerto pulmonar y aumenta significativamente el riesgo de rechazo agudo y disfunción del órgano a largo plazo (7,8). Su incidencia aproximada es de un 41% tras el trasplante pulmonar, y es la causa más frecuente de mortalidad en las primeras 72 horas y de prolongación de estancia en unidades de cuidados intensivos, con una mortalidad del 40% a los 30 días (9).

2. FISIOPATOLOGÍA

La fisiopatología del SIR pulmonar es muy compleja, ya que el pulmón es un órgano cuya oxigenación sucede tanto a través de los vasos pulmonares como por la difusión del oxígeno desde los alveolos, por lo que la isquemia pulmonar no produce anoxia necesariamente.

Durante la isquemia prolongada sin ventilación, la hipoxia (cuando la presión alveolar de oxígeno es menor de 7mmHg) hace que se detenga el metabolismo aerobio y la síntesis de ATP mitocondrial, activándose el anaerobio, lo cual produce acidosis y depleción de ATP, que se degrada hasta productos finales tóxicos como la xantina y la hipoxantina (10). La depleción de ATP produce una disfunción de las bombas ATP-dependientes, lo que genera edema celular y una salida de calcio al citosol, activando enzimas calcio-dependientes como las fosfolipasas, y proteasas y endonucleasas, que conducen a la lisis celular (11,12). Durante la isquemia, con o sin hipoxia, la pérdida de mecanotransducción en arteriolas y capilares por ausencia de flujo sanguíneo, induce a macrófagos y células endoteliales a generar radicales libre de oxígeno (RLO) y a producir citoquinas proinflamatorias, y moléculas de adhesión (11,13).

Con la reperfusión, se restaura el flujo sanguíneo y la oxigenación. El exceso de oxígeno da lugar a la formación masiva de RLO, lo que produce un importante estrés oxidativo, que junto con los productos tóxicos generados durante la isquemia, alteran la función metabólica de las células pulmonares. Las principales fuentes de RLO son la vía del óxido nítrico (NO), NADPH-oxidasa, o la vía de la xantina-oxidasa. Los RLO dañan las células por peroxidación lipídica de las

membranas plasmática y mitocondrial, produciéndose elevación del calcio intracelular. El exceso de oxígeno induce a los macrófagos alveolares a la producción de citoquinas proinflamatorias y factores quimiotácticos, que promueven el reclutamiento de leucocitos (11).

Como consecuencia del SIR, se producen cambios moleculares y tisulares, que tiene como resultado una respuesta inflamatoria mediada por RLO, células y moléculas que culminan en daño celular y endotelial y disfunción del órgano.

2.1. Respuesta inflamatoria

1. Mediadores celulares

El daño por IR es un **proceso bifásico** en el que existe una *fase precoz* mediada por macrófagos, seguida por una *fase tardía* (con un pico de daño a las 24h de la reperfusión) en la que se produce reclutamiento y activación de linfocitos y neutrófilos (14,15). Cuando se refiere al SIR producido por trasplante pulmonar, los macrófagos alveolares del donante se activan durante la isquemia, iniciando la activación del sistema inflamatorio del receptor inmediatamente tras la reperfusión, implicándose en la fase tardía los neutrófilos y los linfocitos de éste (11,16).

a) Macrófagos: En el pulmón existen tres tipos de macrófagos residentes: los que se encuentran en el moco bronquial, los intersticiales y los alveolares. Los

macrófagos alveolares (MA) son los más abundantes de los macrófagos residentes en el pulmón, y suponen una defensa frente a microorganismos y partículas inhaladas mediante fagocitosis y además participan en el aclaramiento del surfactante (17). Los MA pueden originarse a partir de la división postmitótica de los macrófagos intersticiales o ser reclutados a partir de células progenitoras de la médula ósea o de monocitos circulantes en la sangre. Existen tres fenotipos fundamentales de los MA: basal, subtipo proinflamatorio (M1) y subtipo antiinflamatorio (M2) (18). En su estado basal, el MA expresa receptores que le permite la eliminación de microorganismos y partículas inhaladas. Se diferencian hacia M1 en respuesta a diferentes estímulos como endotoxinas, baja tensión de oxígeno, RLO, interferón-gamma (IFN- γ), interleuquina-1 beta (IL-1 β), factor de necrosis tumoral-alfa (TNF α). M1 son fundamentalmente inflamatorios, y se implican en la producción de óxido nítrico, RLO, enzimas hidrolíticas, y citoquinas proinflamatorias. M1 se transforma en M2 frente a diferentes estímulos (IL antiinflamatorias y la elongación celular) y sintetizan IL-4 e IL-10, cesan el reclutamiento de leucocitos, inducen apoptosis de neutrófilos y macrófagos y favorecen la reparación de tejidos (17). Existe abundante evidencia que apoya el importante papel de los MA en la iniciación y propagación del SIR pulmonar. Los MA son activados durante la isquemia y al inicio de la reperusión, tras lo cual producen RLO y secretan enzimas proteolíticas, agentes procoagulantes y citoquinas proinflamatorias y quimiotácticas, como IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF α , INF γ , MIP-2 (macrophage inflammatory protein-2) y MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1), que promueven el reclutamiento de monocito-

macrófagos, neutrófilos, linfocitos y plaquetas (7,16). Los MA activan a las células endoteliales mediante citoquinas, las cuales producen a su vez, otras citoquinas, moléculas de adhesión, derivados del ácido araquidónico y óxido nítrico (NO), favoreciendo un estado proinflamatorio y protrombótico (19). Además, los macrófagos intervienen en la activación de los neumocitos tipo II y la producción por estos de citoquinas y factores quimiotácticos (16,20).

b) Neutrófilos o polimorfonucleares (PMN): Los neutrófilos migran hacia el pulmón guiados por citoquinas y factores quimiotácticos sintetizados por los MA y otras células pulmonares en respuesta a la IR (21). El secuestro pulmonar de neutrófilos se inicia ya durante la fase de isquemia, pero es durante la reperfusión cuando progresa significativamente, ejerciendo sus efectos varias horas después. La infiltración leucocitaria incluye varios eventos secuenciales, mediados por citoquinas (IL-8) y moléculas de adhesión (selectinas, integrinas, ICAM-1, VCAM...) de la superficie de neutrófilos y células endoteliales, cuya expresión se induce por $\text{TNF}\alpha$ producido predominantemente por los MA (7,12). Cuando los neutrófilos activados alcanzan el espacio extravascular, liberan RLO, citoquinas y proteasas, que dañan a las células parenquimatosas pulmonares y al endotelio, produciendo disfunción de la membrana alveolo-capilar, y como consecuencia edema pulmonar y alteración del intercambio de gases (11). Además, los neutrófilos contribuyen al SIR pulmonar mediante obstrucción de los capilares pulmonares, impidiendo la correcta reperfusión del tejido (22).

- c) Linfocitos T:** Las células T pueden ser activadas de manera independiente de antígeno en situaciones de estrés oxidativo y a través de citoquinas sintetizadas por macrófagos (TNF α , IFN γ , IL-12, IL-18...)(8). Los LT infiltran el tejido pulmonar en el SIR pulmonar de manera más precoz que los neutrófilos, y parecen intervenir en su activación (11).
- d) Células epiteliales alveolares (neumocitos tipo I):** La alteración de la integridad epitelial resulta en la exposición de estructuras de la matriz extracelular, que interacciona con los MA exacerbando la respuesta inflamatoria. Además la alteración de la barrera epitelial contribuye al edema pulmonar (19).
- e) Neumocitos tipo II:** Se activan por los MA y contribuyen al daño por IR con la liberación de citoquinas proinflamatorias y quimioquinas, promoviendo la infiltración tisular por neutrófilos (8). La función de los neumocitos II también se ve comprometida en el daño pulmonar por IR, alterándose la producción y composición del surfactante (11).
- f) Células endoteliales:** La destrucción de la barrera endotelial promueve el edema pulmonar y la migración linfocitaria. Las células endoteliales, participan en el daño tisular por estrés oxidativo en el daño pulmonar por IR, generando RLO como respuesta al cese de mecanotransducción por ausencia de flujo sanguíneo durante la isquemia (8). Sintetizan endotelina-1, que es una potente vasoconstrictora y estimula la producción de citoquinas por los

macrófagos, incrementa la expresión de iNOS (Oxido-nítrico sintasa inducible) y promueve a infiltración de PMN (11).

2. Mediadores moleculares

En el daño pulmonar por IR, los macrófagos y otras células son estimulados para producir múltiples sustancias tales como NO, citoquinas, derivados del ácido araquidónico, factor activador de plaquetas (PAF) y complemento. Todas esas moléculas desencadenan y modulan respuesta inflamatoria y sus consecuencias.

a) Citoquinas: Las citoquinas son un conjunto de proteínas de bajo peso molecular (generalmente menor de 30kDa). Se sintetizan principalmente por macrófagos y neutrófilos activados, por linfocitos T en menor medida, y por células no inmunes en determinadas circunstancias. Su función es inmunorreguladora, siendo fundamentales en la interacción de las células del sistema inmune entre sí y con otras células. Se unen a receptores específicos de la membrana de las células donde van a ejercer su función, iniciando una cascada de transducción intracelular que altera el patrón de expresión génica, produciendo una determinada respuesta biológica. Las citoquinas dirigen la respuesta inmune innata y la respuesta inmune específica e intervienen en la inflamación, la cicatrización y en la hematopoyesis. Existen cinco familias principales de citoquinas: *Citoquinas inflamatorias* (pro y antiinflamatorias),

hematopoyéticas, producidas por linfocitos Th1 y Th2 y quimioquinas (citoquinas con efecto quimiotáctico).

Citoquinas inflamatorias:

Múltiples estudios han demostrado que la IR de órganos sólidos como riñón, hígado, corazón y pulmón induce la rápida liberación de citoquinas proinflamatorias (7). En el trasplante pulmonar en humanos se pueden detectar múltiples citoquinas (tabla 1) en tejido pulmonar durante la isquemia y tras la reperfusión (7,23).

Tabla 1: Fuente y función de citoquinas implicadas en el SIR pulmonar durante el trasplante

Citoquina	Fuente celular principal	Función
TNF- α	Macrófagos, Linfocitos	Proinflamatoria
IFN- γ	Macrófagos, Linfocitos	Proinflamatoria
MCP-1	Células inmune, células epiteliales pulmonares	Quimiotaxis de macrófagos
IL-1 β	Macrófagos, fibroblastos	Proinflamatoria
IL-2	Linfocitos	Proliferación de células T
IL-6	Macrófagos, células endoteliales, células epiteliales	Proinflamatoria
IL-8	Macrófagos, células epiteliales, fibroblastos	Quimiotaxis de neutrófilos
IL-10	Macrófagos, linfocitos	Antiinflamatoria
IL-12	Macrófagos	Activación células T
IL-18	Macrófagos	Activación células T

Estas citoquinas y quimiocinas se sintetizan principalmente por los MA, granulocitos y linfocitos (aunque también por células no inmunes) y juegan un papel muy importante en el daño pulmonar por IR, causando la activación

de células endoteliales, sobrerregulación de moléculas de adhesión y el tráfico de leucocitos al lugar de inflamación (24).

El $\text{TNF}\alpha$ es la citoquina más precoz y probablemente la más abundante producida por los MA en respuesta a IR. Estimula la producción de otras citoquinas como IL-1 β , IL-6 e IL-10, además induce a las células epiteliales respiratorias a producir IL-8, implicada en la respuesta inflamatoria, activación del complemento, shock séptico y disfunción multiorgánica (11). Además, el $\text{TNF}\alpha$ inhibe la formación de surfactante por parte de los neumocitos tipo II (25). Se ha demostrado que también IL-1 β e INF γ se sintetizan de manera temprana por los MA. En modelos animales experimentales de IR pulmonar *in vivo*, se muestra, que bloqueo de $\text{TNF}\alpha$, IL-1 β , ó INF γ se asocia a una protección frente al daño pulmonar por IR, disminuyendo la infiltración por neutrófilos y la secreción de citoquinas (15,26). La IL-8 es uno de los principales factores quimiotácticos de PMN, produciéndose en altas concentraciones durante el SIR pulmonar(27).

Citoquinas quimiotácticas o quimioquinas:

Constituyen un grupo de citoquinas de pequeño tamaño implicadas en el tráfico celular. Existen más de 50 quimioquinas, que se subdividen en cuatro familias según el número y el residuo de cisteína conservada en el N-terminal de la molécula (C, CC, CXC y CX₂C). Se secretan en respuesta a diversas señales e intervienen en el reclutamiento de monocitos, neutrófilos y linfocitos, que expresan receptores específicos para ellas. Desarrollan su efecto a través de su

unión a receptores de membrana acoplados a proteína G, que ponen en marcha cascadas intracelulares que inducen migración de la célula hacia la fuente productora de quimioquinas. Se pueden dividir en dos grupos funcionales: *homeostáticas* (realizan una función defensiva regulando a los leucocitos navegantes hacia órganos linfoides y también en médula ósea durante la hematopoyesis) e *inflamatorias* (regulan el reclutamiento de leucocitos hacia el lugar de inflamación o daño tisular) (28).

MPC-1 (Proteína quimiotáctica de monocitos-1): MCP-1 es una quimioquina de la familia C-C es un potente factor quimiotáctico de monocitos y macrófagos. Su gen se localiza en el cromosoma 17 (17q12). Se compone de 76 aminoácidos y tiene un tamaño de 17kDa. Se expresa por numerosas células (células monocíticas principalmente, pero también por células endoteliales, epiteliales, fibroblastos, músculo liso...) de manera constitutiva o bien en respuesta a estrés oxidativo, citoquinas (TNF α , IL-1 β) o factores de crecimiento (29), y tiene como función la regulación del reclutamiento de monocitos y otras células inmunes como linfocitos T y células NK (Natural killer) (28). Se ha demostrado por diferentes autores, la relación de MCP-1 en con la etiopatogenia del daño pulmonar por IR en la fase temprana, demostrándose que su neutralización con un anticuerpo específico, disminuye el índice de permeabilidad vascular pulmonar en un 80% a los 30 min de la reperusión y la producción de citoquinas (15).

b) Otros mediadores inflamatorios

La IR induce la activación del complemento que produce contracción del músculo liso, aumento de la permeabilidad vascular (7).

La fosfolipasa A₂ (PLA₂) es una enzima que se libera de los lisosomas de los macrófagos, hidroliza uniones ésteres de los fosfolípidos de membrana y se generan metabolitos del ácido araquidónico (7,11).

Las células endoteliales y los MA a liberan factores procoagulantes y antitrombóticos que provocan trombosis microvascular (7). Además, la adhesión de PMN y plaquetas taponan arteriolas, vénulas y capilares alveolares (11). Todo ello genera dificultad de la perfusión del órgano debido a la obstrucción mecánica de la microcirculación, con acúmulo de eritrocitos y edema intersticial, dando lugar al fenómeno de *no reflow*.

2.2. Muerte celular

El papel de los neutrófilos, ROS y mediadores inflamatorios tras isquemia-reperfusión han sido ampliamente estudiados, sin embargo contribuyen sólo en parte al SIR pulmonar. Las vías finales que dan lugar al daño celular, necrosis y apoptosis del epitelio pulmonar aún no han sido aclarados totalmente.

2.2.1. Necrosis:

Se debe a la pérdida de energía asociada a la depleción de ATP inducida por la hipoxia que se produce en la fase de isquemia. La célula necrótica sufre una hinchazón y disrupción de la membrana con liberación de enzimas proteolíticas, que da lugar a una inflamación de tejidos circundantes y una infiltración leucocitaria (30).

2.2.2. Apoptosis:

Es una muerte celular autoprogramada. Se trata de un proceso activo dependiente de energía que se desencadena tras un daño celular no tan severo como para producir necrosis. Se caracteriza por encogimiento nuclear, condensación de la cromatina y fragmentación del DNA formando los cuerpos apoptóticos, pero la membrana celular permanece intacta y las células apoptóticas son rápidamente fagocitadas por macrófagos, lo cual limita la liberación de sustancias inflamatorias intracelulares (30-32).

El deterioro de función pulmonar tras la IR se asocia más al grado de necrosis de las células pulmonares y no a la apoptosis, ya que las células necróticas dan lugar a un alto grado de respuesta inflamatoria (31). Los largos períodos de isquemia pulmonar fría (>18h) sin reperfusión, se asocia a un alto porcentaje de necrosis pero no de apoptosis. La reperfusión del tejido pulmonar tras la isquemia se asocia a la aparición de apoptosis, y su porcentaje con respecto a la necrosis depende de la duración de la isquemia, predominando la apoptosis frente a la necrosis excepto en los casos de isquemia muy prolongada (18-24h de isquemia

fría) (33). La apoptosis del neumocito tras el daño pulmonar por IR, tiene lugar predominantemente tras la reperfusión, aumentando rápidamente hasta un pico máximo a las 2h, descendiendo después (31).

a) Apoptosis dependiente de caspasas:

Las **caspasas** son proteínas cisteín-proteasas, definidas por la presencia del aminoácido cisteína en su lugar activo, y que todas fragmentan sus proteínas diana tras un residuo de ácido aspártico (cisteín-aspartato-proteasas). Todas ellas son expresadas como proenzimas inactivas (30 a 50 kD), cuya activación implica su procesamiento proteolítico, dando lugar a dos fragmentos que constituyen el enzima activo (34). Se dividen en 2 grupos según su función: *caspasas inflamatorias* (implicadas en la producción de citoquinas) y *caspasas mediadoras de la apoptosis*, que se dividen en: iniciadoras (2, 8, 9 y 10) y efectoras de muerte o ejecutoras (3, 6 y 7).

Las caspasas iniciadoras se activan tras un estímulo apoptótico mediante autoproteolisis y se fragmentan unas a otras, iniciándose una cascada proteolítica que se propaga hasta que las efectoras activan a la Poli-ADP-polimerasa, produciéndose fragmentación del DNA. Las caspasas rompen también proteínas del citoesqueleto y proteínas implicadas en el contacto intercelular, haciendo que la célula apoptótica sea fácilmente fagocitada (35). Una vez activada la cascada de las caspasas, procesos de retroalimentación positiva aseguran que la célula inevitablemente sufrirá apoptosis. Las caspasas son pues, las principales ejecutoras de la apoptosis.

Las **dos vías principales de la apoptosis dependiente de caspasas** son:

VIA EXTRÍNSECA: Se activa por la interacción de receptores de la superficie celular (receptores de muerte) con sus ligandos, como TNF/TNF-R, Fas (CD95)/Fas-ligando (CD95-L) y Angiotensina AII/AII-Receptor. Esta unión da lugar a la activación de la *cascada de las caspasas* y a la reducción de la expresión de la variante antiapoptótica Bcl-2. La cascada de las caspasas se inicia con la activación de la caspasa-8 (iniciadora), la cual activa a su vez a las caspasas efectoras (3, 6 y 7), que producen fragmentación del DNA en cuerpos apoptóticos a través de la activación de la Poli-ADP-ribosa polimerasa (PARP) (36).

VIA INTRÍNSECA O MITOCONDRIAL: Se activa por estrés intracelular (isquemia, estrés oxidativo), radiaciones ionizantes, agentes químicos, etc. Esta vía se caracteriza por la permeabilización de la membrana externa mitocondrial (poro) y la liberación de citocromo C al citosol, donde forman un complejo llamado Apoptosoma junto con Apaf-1 (apoptotic protease activating factor-1) y la caspasa-9. Apaf-1 hidroliza ATP y se estabiliza su unión a citocromo C, que reclutan a la procaspasa-9 e inducen su activación mediante autocatálisis (36). El apoptosoma corta y activa a la caspasa-3, que junto a las caspasas-6 y -7, fragmenta el ADN dando lugar a la muerte celular (37). Esta vía es modulada por las proteínas de la familia Bcl-2.

Proteínas de la familia Bcl-2: Es una familia de proteínas intracelulares, que consta de alrededor de 24 miembros, cuya función es la regulación de procesos de permeabilización mitocondrial, constituyendo un punto clave en el desarrollo de la

apoptosis. Su nombre deriva de la proteína fundadora, el protooncogén Bcl-2 (B-cell lymphoma-2), descubierto en linfomas foliculares, que mostraba una translocación entre los cromosomas 14 y 18. A diferencia de otros oncogenes, no estaba implicado en la proliferación celular, sino en el bloqueo de la muerte celular por apoptosis. Las proteínas de la familia Bcl-2 vienen definidas por la presencia de al menos uno de los cuatro dominios de homología con Bcl-2 (Bcl-2 Homology: BH₁, BH₂, BH₃, BH₄). Se dividen en 2 grupos según su función:

- Proapoptóticas: Proteínas multidominio-BH (Bax, Bak y Bok) y proteínas dominio único-BH₃ (Bid, Bad y Bim)(38). Estas proteínas inducen apoptosis facilitando la permeabilización de la membrana externa mitocondrial (39).
- Antiapoptóticas: (Bcl-2, Bcl-X_L, A1 y Mcl-1). Estos miembros de la familia, tienen como papel principal, secuestrar moléculas con dominio único BH₃, como Bid, previniendo la activación de Bak y Bax. Tienen en común el dominio BH₄, en el que parece residir su capacidad antiapoptótica.

Bcl-2 es una proteína antiapoptótica bien conocida, aislada por primera vez en una célula linfoma B, y se ha demostrado que es oncogénica por inhibición de la apoptosis. Se cree que esta proteína inhibe la apoptosis estabilizando la membrana mitocondrial, evitando la liberación del citocromo C al citosol (40), evitando la formación del apoptosoma. En el daño pulmonar por IR se ha demostrado reducción de los niveles de proteínas Bcl-2 y Bcl-X_L, que se corresponde con una elevación de la apoptosis (41). Parece que el balance de la

actividad Bax/Bcl-2 determinaría la susceptibilidad de las células del epitelio alveolar a la apoptosis (36).

b) Apoptosis independiente de caspasas:

Existe evidencia de la existencia de vías alternativas de apoptosis independientes de caspasas, mediadas por otras proteasas que se activan por receptores específicos o por la vía mitocondrial. Se piensa que los lisosomas están implicados en este tipo de apoptosis, mediante la liberación de enzimas proteolíticas de su interior (42,43).

PREVENCIÓN DEL DAÑO PULMONAR POR ISQUEMIA- REPERFUSIÓN

El número anual de trasplantes pulmonares está en constante aumento, por lo que han elevado los esfuerzos por disminuir el SIR pulmonar, tratando de mejorar la preservación de los pulmones del donante, minimizando los daños por isquemia y almacenamiento del órgano (mediante soluciones de preservación pulmonar, hipotermia, expansión pulmonar del injerto durante el período de isquemia, reperfusión retrógrada, perfusión ex vivo del injerto...).

A pesar de estas medidas, el SIR pulmonar continúa siendo la primera causa de fallo agudo del injerto pulmonar y la causa más frecuente de mortalidad en las primeras 72 horas. Además existen otras situaciones en las que se tiene que someter al pulmón a períodos de isquemia más o menos prolongados y no es posible realizar un enfriamiento progresivo del órgano y correcta preservación, por lo que se han estudiado otros métodos para tratar de minimizar los efectos deletéreos del SIR pulmonar. La mayoría son experimentales y se han investigado en modelos animales. Entre ellos se encuentran (13,44,45):

- Administración exógena de surfactante, NO Inhalado, prostaglandinas, quelantes de hierro...
- **Terapias antioxidantes:** Inhibidores de la xantina oxidasa, inhibidores de la NADPH oxidasa, fármacos “quelantes” de radicales libres (manitol, dimetil sulfóxido), fármacos inhibidores de enzimas productoras de oxidantes (azul de

metileno, N-acetil cisteína), antioxidantes (vitaminas A y E, enzimas como SOD, hemooxigenasa-1...) etc.

- **Terapias antiinflamatorias:** corticoides, depleción de macrófagos alveolares y neutrófilos, inhibidores y antagonistas de citoquinas, factores de transcripción y moléculas de adhesión, inhibidores del complemento, inhibidores de protein-quinasas...).
- Terapias génicas, células madre mesenquimales, factores de crecimiento.
- Inhibidores de la apoptosis, protección mitocondrial.
- **Precondicionamiento:** Es un fenómeno que consiste en la exposición de un órgano o tejido a estímulos subletales, que le confiere resistencia a un estímulo nocivo posterior de mayor duración o severidad (46). Se han descrito distintos tipos de preconditionamiento, como son el hipertérmico, isquémico, farmacológico y anestésico (45).

PRECONDICIONAMIENTO ISQUÉMICO

El preconditionamiento isquémico (PCI) es uno de los mecanismos más potentes para minimizar lesiones por IR. Es un método por el cual se somete a un órgano a un período breve de isquemia previo a una agresión isquémica mayor con el fin de reducir la extensión del daño por IR. Puede ser mecánico o farmacológico, directo (sobre el órgano diana) o indirecto (la isquemia de un órgano o región protege a órganos remotos)(47).

1. HISTORIA

El PCI se describió por Murry y su equipo en 1986 en un modelo canino, en el que la realización de varios períodos breves de IR coronaria, conferían una protección frente a una isquémica miocárdica posterior más prolongada, reduciendo la zona de infarto en un 75%, en comparación con el grupo control. Se definió el fenómeno como “una respuesta rápida y adaptativa a una isquemia breve que enlentece la tasa de muerte celular durante un episodio posterior de isquemia prolongada” (46). Además del miocardio, se han estudiado los beneficios del PCI en distintos modelos animales en otros órganos como el hígado (48), cerebro (49), médula espinal (50), riñón (51), músculo (52) y pulmón.

2. MECANISMOS

El PCI ejerce una protección en dos marcos temporales, con distintos mecanismos de actuación (53,54) (Figura 1):

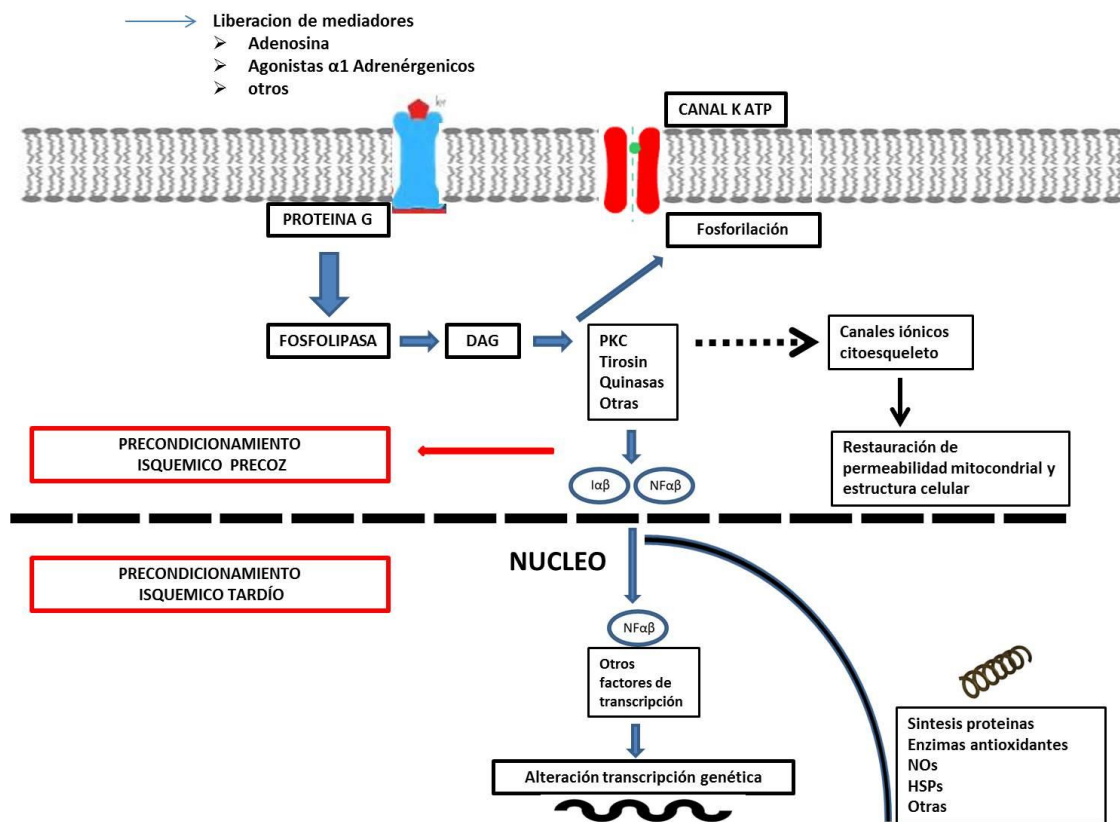


Figura 1: Mecanismos del preconditionamiento isquémico precoz y tardío

2.1. La fase precoz, ventana temprana o clásica

Desde el inicio de la reperusión hasta las 2 horas posteriores. El efecto protector tan inmediato, sugiere la presencia de mediadores preformados liberados localmente (adenosina, bradicinina, endotelinas...) que ejercen su acción uniéndose a receptores de membrana acoplados a proteína G, que activan vías de señalización intracelular y finalmente actúan sobre canales iónicos y el citoesqueleto, restaurando la permeabilidad mitocondrial y la estructura celular (54,55). Además, se activan factores de transcripción, que inician un cambio en la

expresión génica (54,56,57). Es una fase independiente de la síntesis de proteínas pero en la que se producen cambios proteicos postranslacionales modificando proteínas preexistentes (58).

2.2. Segunda ventana de protección o preconditionamiento tardío:

Fue descrito en 1993 por los grupos de Marber y Kuzuya (53). Descubrieron la reaparición de un efecto cardioprotector a las 12-24 horas del PCI, que ejerce su efecto durante 48-96 horas. La protección es de menor intensidad pero más duración y se debe a mecanismos complejos que producen la activación de diversos genes implicados en la generación de un fenotipo defensivo. El hecho de que el efecto protector sea abolido por un inhibidor de la síntesis de proteínas como es la cicloheximida, refuerza la hipótesis de que en esta segunda ventana se produce la síntesis de una o varias proteínas protectoras, entre las cuales se encuentran los enzimas iNOS II (óxido nítrico sintasa inducible), COX-2 (ciclooxigenasa-2), aldosa reductasa, superóxido dismutasa (SOD), protein kinasas activadas por mitógenos, proteínas de choque térmico y los canales de K_{ATP} de la mitocondria (59,60).

El PCI produce una protección bifásica: primero un estímulo protector fuerte pero breve, seguido de una protección más tardía, menos potente pero larga. Lo períodos repetitivos de PCI no son aditivos ni acumulativos pero convierten la protección bifásica en una monofásica (61). Además, los efectos del PCI no se

remiten solamente al órgano precondicionado, sino que afectan a órganos remotos, demostrando un efecto sistémico del PCI, de hecho, en 1993, Przyklenk (62) y su grupo demostraron los prometedores resultados del PCI remoto, y múltiples estudios posteriores demostraron su eficacia, siendo en la actualidad la colocación de un torniquete en una extremidad (ciclos cortos de IR) el método más frecuente de PCI remoto (63).

El PCI produce en los órganos y tejidos, una tolerancia tanto a la isquemia como a la reperusión (64,65) (Tabla 2).

Tabla 2: Principales efectos protectores del preconditionamiento isquémico

Tolerancia isquémica celular	Tolerancia a la reperusión
Reducción de necesidades energéticas	Reducción en la producción de RLO
Mayor conservación de sustratos energéticos	Mantenimiento del potencial redox intracelular
Disminución del metabolismo	Preservación de la integridad mitocondrial
Mayor eficacia en la regulación del balance iónico y ácido-base	Reducción de los leucocitos activados y la producción de citoquinas, factores quimiotácticos y moléculas de adhesión
Disminución de la necrosis celular	Disminución de la apoptosis

PRECONDICIONAMIENTO ISQUÉMICO SOBRE EL PULMÓN

1. MODELOS ANIMALES:

Existe relativamente poca evidencia científica de los efectos del PCI sobre el daño pulmonar por IR, pero se ha demostrado que el PCI puede atenuarlo en varios modelos experimentales realizados en cerdos (66,67), conejos (68-72), perros (73,74) y en ratas (68). También existen publicaciones sobre su aplicación en humanos sometidos a resecciones pulmonares mayores (66). La tolerancia a la IR pulmonar, es específica de cada animal, siendo mayor en grandes mamíferos (75) que en roedores (76), por lo que existe cierta variabilidad en los resultados del PCI según el animal que se utilice. Se han utilizado **varios modelos** animales experimentales para reproducir IR en pulmón y realizar PCI sobre ellos : modelos trasplante pulmonar (con isquemia fría (66,68,71) o isquemia normotérmica (77)), modelos de pulmón aislado perfundido con solución de preservación (59,70), pulmón aislado perfundido y ventilado (67,72) y modelos de isquemia pulmonar normotérmica mediante bloqueo hilar o de la arteria pulmonar (64,67,69).

Los investigadores realizan sobre estos modelos de daño pulmonar por IR, un PCI mediante **bloqueo de ventilación, perfusión o ambas**. Featherstone y su equipo demostraron en un modelo de pulmón aislado de rata, que el PCI con bloqueo de ventilación y perfusión, es más efectivo que la interrupción de la ventilación o de la perfusión aisladamente (72). Otros grupos han demostrado la eficacia del PCI mediante oclusión de la arteria pulmonar (69,73,78). Existen también **variaciones**

en cuanto a la duración y número de ciclos de isquemia aplicados: en la mayoría de los modelos se realizan varios ciclos (2-3) de isquemia intermitente de 5-10 minutos (59,64-68,71,77).

2. EFECTOS DEL PRECONDICIONAMIENTO ISQUÉMICO PULMONAR:

En los modelos estudiados, el PCI ha demostrado:

- **Mejoría de la función pulmonar:** Mejor intercambio de gases y oxigenación (65,66,72), mejoría de la mecánica pulmonar (mayor complianza y menor presión en vías respiratorias) (70), disminución de la disfunción vascular pulmonar (disminución de resistencias vasculares pulmonares) (59,60,65,66,70,79) .
- **Reducción del estrés oxidativo en tejido pulmonar:** Los RLO producen peroxidación lipídica (LPO) de las membranas celulares, generándose aldehídos y sustancias reactivas que se utilizan como indicadores del grado de LPO. En varios de los trabajos revisados, se demuestra la reducción de estos indicadores tras la aplicación de PCI (65,66), otros muestran una elevación de la superóxido-dismutasa (SOD) (enzima antioxidante endógena) (64-66,72,79). En el trabajo de Jun 2009, se observa un aumento de expresión de genes relacionados el sistema antioxidante endógeno (71).

- **Reducción de la reacción inflamatoria en tejido pulmonar:** En varios de los trabajos revisados se observa menor grado de edema pulmonar (64,65,72,79), disminución de infiltración por PMN (60,66), menor actividad mieloperoxidasa (método de detección de neutrófilos activados) (67).

Disminución de citoquinas proinflamatorias IL-1, TNF α y MCP-1 (71), reducción de IL-6 y TNF α y aumento de IL-10 (antiinflamatoria) (79), disminución de la expresión génica de la mayoría de citoquinas proinflamatorias y moléculas de adhesión (66,73). Reducción de la producción de tromboxano B₂ (66).

- **Modificación de la expresión génica:** En el experimento de Jun se utilizan microarray para mostrar los patrones de modificación de la expresión génica, demostrando que el efecto del PCI es más intenso durante las primeras 6 horas tras reperusión y que se mantiene al menos durante 24 horas. Los genes modificados están relacionados con el proceso inflamatorio y la apoptosis (citoquinas y sus receptores, factores quimiotácticos y sus ligandos, moléculas de adhesión, proteínas mediadoras de apoptosis, enzimas relacionadas con el metabolismo celular, moléculas oxidantes y canales iónicos) (71).

- **Reducción de la apoptosis en tejido pulmonar:** Yang 2002 observa en pulmones de pacientes preconditionados un menor índice de apoptosis, concluyendo que el PCI podría reducir la apoptosis mediante la sobrerregulación de Bcl-2 (73).

JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO

En resumen, la disfunción pulmonar producida por el SIR es clínicamente significativa y grave en varias situaciones como son el trasplante pulmonar, resecciones pulmonares complejas, bypass cardiopulmonar, embolismo pulmonar, y patologías pulmonares diversas. Son situaciones en las cuales se somete al pulmón a un período de isquemia de manera inevitable y una posterior reperusión, que desencadena un SIR con severas consecuencias que condicionan la viabilidad del órgano y la morbimortalidad. Por todo lo anterior es de gran interés el desarrollo de métodos de protección pulmonar frente al SIR.

El PCI podría ser de gran utilidad como mecanismo modulador o protector de los principales mecanismos fisiopatológicos del SIR pulmonar, como son, el desarrollo de la respuesta inflamatoria más precoz, mediada por los macrófagos, y el inicio de mecanismos apoptóticos dependientes de caspasas.

HIPOTESIS Y OBJETIVOS

1. HIPÓTESIS

Cada vez es más habitual en la práctica clínica enfrentarse a procedimientos quirúrgicos en los que el pulmón se ve sometido a períodos de isquemia prolongados, con el consiguiente riesgo de daño pulmonar por isquemia-reperfusión (IR) y aumento de la morbilidad postquirúrgica. La investigación experimental, es fundamental en la búsqueda y validación de estrategias terapéuticas que ayuden a minimizar el daño pulmonar secundario a IR. El Precondicionamiento Isquémico (PCI), una técnica que somete a breves periodos de IR a tejidos y órganos que van a sufrir un periodo de isquemia prolongado y potencialmente letal, es uno de los mecanismos descritos más potentes para minimizar los efectos nocivos de la IR. Sin embargo, son pocos los estudios relativos al PCI pulmonar y, aún menos, los estudios que profundizan en cómo sus efectos modifican la expresión inmunohistoquímica de la inflamación y apoptosis en las fases precoces de la reperfusión pulmonar. Así pues, nos planteamos como hipótesis de esta investigación que el efecto protector el PCI sobre la IR pulmonar puede ponerse de manifiesto, en un modelo experimental de IR, en cambios histológicos y en la expresión inmunohistoquímica de mediadores inflamatorios y apoptóticos.

2. OBJETIVOS:

Para intentar demostrar la hipótesis planteada, se diseñó un protocolo experimental consistente en un modelo de autotrasplante pulmonar en cerdo para el estudio histológico e inmunohistoquímico del pulmón sometido a una isquemia prolongada y un breve periodo de reperfusión (30 minutos). La realización de maniobras de PCI pulmonar permite valorar, como objetivo principal de este estudio, los efectos del PCI en este proceso.

Los objetivos específicos para alcanzar el objetivo principal fueron:

1. Analizar, en el pulmón sometido a IR si, tras 30 minutos de reperfusión, se observan cambios microscópicos morfológicos, y si la realización de PCI pulmonar los modifica.
2. Investigar si en este modelo de IR pulmonar, mediante estudios inmunohistoquímicos, se puede detectar infiltración monocito/macrofágica en el pulmón y si el PCI afecta a esa infiltración.
3. Analizar si la expresión inmunohistoquímica de MCP-1 (proteína quimiotáctica de monocitos 1) se modifica precozmente durante la reperfusión, si se asocia con el grado de infiltración por monocitos/macrófagos y si el PCI altera estos efectos.

4. Estudiar, si en este modelo, la respuesta apoptótica secundaria a la IR pulmonar se manifiesta en la expresión de la proteína proapoptótica Caspasa 9 o la proteína antiapoptótica Bcl-2, y si el PCI modula esta respuesta.

MATERIAL Y MÉTODOS

RESUMEN DEL EXPERIMENTO

Para evaluar la posible protección del PCI sobre los efectos del SIR en el pulmón, se diseñó un modelo experimental de autotrasplante pulmonar en cerdo, consistente en una neumonectomía izquierda, lobectomía craneal *ex-situ*, reimplantación del lóbulo caudal y reperusión del mismo durante 30 minutos.

Se realizaron 16 procedimientos quirúrgicos divididos en **3 grupos**: grupo control (CON), grupo de preconditionamiento isquémico (PCI) y grupo de cirugía simulada (SHAM).

Durante el procedimiento se analizaron diferentes parámetros gasométricos y hemodinámicos, así como muestras tisulares (para tinción hematoxilina-eosina y realización de inmunohistoquímica), para el estudio del SIR pulmonar y el efecto del PCI sobre la respuesta inflamatoria y apoptótica.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. MATERIAL

1.1. Material biológico: Animales

Los experimentos descritos se llevaron a cabo en 16 cerdos de la raza Large-White de ambos sexos, con pesos comprendidos entre 35 y 45 kg. Los animales proceden de la granja del Instituto Tecnológico de Desarrollo Agrario (ITDA) de la Consejería de Medio Ambiente de la Comunidad de Madrid, establecimiento autorizado inscrito con el número EX 013-C en el Registro Oficial de establecimientos de cría, suministradores y usuarios de animales para la experimentación y otros fines científicos de la Comunidad de Madrid, según la Orden de 4 de Agosto de 1989 (BOCM de 24 de Agosto).

El traslado de los animales hasta las instalaciones de la Unidad de Medicina y Cirugía experimental del Hospital General Universitario Gregorio Marañón de Madrid se realiza 24 horas antes del procedimiento, en una jaula individual hasta el momento de la intervención. El animalario se encuentra a una temperatura entre 20-22°C y una humedad relativa del 55%.

El manejo de los animales de experimentación, se ha llevado a cabo siguiendo la normativa legal según el *Real Decreto 1201/2005 de 10 de Octubre* y *B.O.E de 21 Octubre de 2005 Animales, protección de los utilizados para experimentación y*

otros fines científicos (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación) que posee las disposiciones legales reglamentarias y administrativas de los estados miembros de la CEE respecto a la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos de la *Directiva del Consejo 86/609/CEE* (Leg. CC.EE.4390) aprobada el 24 de Noviembre de 1996.

1.2. Características de los quirófanos y material quirúrgico

El quirófano (Figura 2) consta de mesas quirúrgica, lámparas de alta intensidad, catéteres vasculares, instrumental quirúrgico estándar así como el material de microcirugía y específico de cirugía torácica. Respecto a los equipos anestésicos, se dispone de un respirador modelo Dräger SA 1 (Dräger Medical AG, Lübeck, Alemania), Capnógrafo Datex Ohmeda 5250 RGM (General Electric Health care, USA), analizador de gases GEM Premiere 5000 y monitor de Swan-Ganz Gasto Continuo (Edwards, Irving, California, USA).



Figura 2: Quirófano de la Unidad de Medicina y Cirugía Experimental del Hospital General Universitario Gregorio Marañón.

2. PROTOCOLO ANESTÉSICO

Se permite a los animales la ingesta de agua hasta el momento de la intervención, manteniéndoles en ayunas para alimentos sólidos las 18 horas previas al procedimiento.

Se procede a la premedicación intramuscular con ketamina (10 mg/kg) y atropina (0,04 mg/kg). Posteriormente se traslada a quirófano, se preoxigena con oxígeno al 100%, y se monitoriza con electrocardiografía (ECG) y pulsioximetría. Se canaliza un vía venosa periférica de 20 G a nivel de la vena dorsal de la oreja a

través de la cual realizaremos la inducción anestésica.

La inducción anestésica se realiza con fármacos endovenosos: Fentanilo (Fentanest®, Kern Pharma) 2,5 mcg/kg, propofol (Diprivan®, AstraZeneca Farmacéutica, Madrid, España) 2 mg/kg, atracurio (Tracrium®, Glaxo Smith Kline) a 0,6 mg/kg. Posteriormente se procede a la intubación orotraqueal y se inicia ventilación mecánica controlada a un respirador Dräger SA1 con un volumen corriente de 8 ml/kg, frecuencia respiratoria de 12-15 respiraciones/min y relación inspiración/expiración de 1:2, para mantener normocapnia (pCO₂ entre 35- 40 mmHg). La fracción inspirada de oxígeno FiO₂ se mantiene en 1 durante todo el procedimiento.

El mantenimiento anestésico se realiza mediante la administración en perfusión continua intravenosa de propofol y bolos de fentanilo, así como dosis suplementarias de relajante muscular cuando se requiere. Se mantiene una perfusión de cristaloides a 5-6 ml/kg/h y si es preciso, como en caso de hipotensión o sangrado, se perfunde solución de coloide, hidroxietilalmidón (“Voluven”, Fresenius Kabi).

Se canalizan, mediante disección quirúrgica, la arteria femoral derecha (9-F) para medición de PA continua y extracción de gasometrías arteriales, y la vena femoral derecha (7,5 F), por la que se introduce el catéter de arteria pulmonar (7,5-F catéter de termodilución, Edwards, Irving, California, USA) para la realización de estudios hemodinámicos en distintos momentos del experimento.

El cerdo es un animal con una uretra en forma de sacacorchos, que impide su

canalización con una sonda urinaria convencional, por lo que se precisa de la realización de una cistostomía suprapúbica para controlar la diuresis horaria a lo largo de la intervención.

Así pues, durante el procedimiento se monitoriza al animal mediante ECG, pulsioximetría, presión arterial invasiva, presión venosa central, catéter de swan ganz (gasto cardíaco, presión media de la arteria pulmonar, presión capilar pulmonar), gasometrías arteriales seriadas y diuresis horaria.

3. PROTOCOLO QUIRÚRGICO

Tras los procedimientos anestésicos preliminares, se realiza una traqueotomía quirúrgica, y se sustituye el tubo oro-traqueal por otro a través de la traqueostomía, lo que facilita la intubación selectiva del bronquio principal derecho durante el acto quirúrgico.

Se coloca al animal en decúbito lateral derecho y se realiza toracotomía izquierda a través del cuarto o quinto espacio intercostal. Se realiza disección de la arteria pulmonar, venas pulmonares craneal y caudal y el bronquio principal izquierdo, tras lo cual se progresa el tubo endotraqueal bajo visión directa al bronquio principal derecho, iniciando la ventilación unipulmonar (se disminuye el volumen corriente a 6 ml/kg para realizar ventilación protectora pulmonar). Para prevenir la trombosis de la arteria pulmonar que se mantiene pinzada durante la cirugía de banco y el reimplante, se realiza heparinización sistémica (300 UI/Kg) en bolo

en el momento de su oclusión.

A continuación, se procede a la cirugía de banco, realizando una lobectomía craneal ex situ. Se perfunde el injerto (Figura 3) a través de arterias pulmonares (anterógradamente) y a través de las venas (retrógradamente) con 1 litro de solución de la Universidad de Wisconsin a 10-15 C°, mientras se ventila el injerto con un ambú (FiO₂ 0,21). Se disecó el pedículo del lóbulo caudal que iba a ser reimplantado, constituido por la arteria pulmonar izquierda, la vena pulmonar caudal y el bronquio principal izquierdo. Finalmente, se realiza el reimplante mediante anastomosis bronquial, sutura arterial y sutura venoauricular. El tubo anillado se retira hacia la tráquea permitiendo la ventilación bipumonar, y la reperfusión del mismo se realiza primero de forma retrógrada, despinzando la aurícula izquierda, y después anterógradamente, despinzando la arteria pulmonar. La perfusión del lóbulo reimplantado se mantiene durante 30 minutos, tras los cuales se procede a la eutanasia (previa profundización anestésica) mediante inducción de cardioplegia con cloruro potásico.

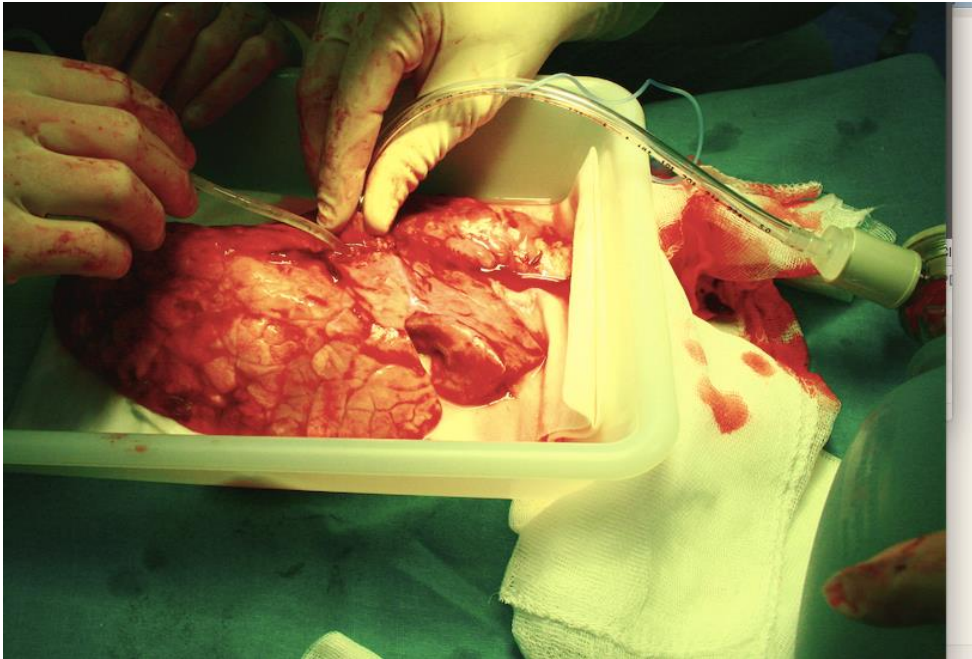


Figura 3: perfusión y ventilación del injerto.

4. INSTALACIONES

Todos los procedimientos quirúrgicos fueron realizados en el quirófano de la Unidad de Medicina y Cirugía Experimental del Hospital General Universitario Gregorio Marañón de Madrid, con número de registro EX/017-U de la Comunidad de Madrid.

El procesamiento de las muestras histológicas, las técnicas de tinción convencional e inmunohistoquímicas, el estudio mediante microscopía óptica de las preparaciones histológicas, la adquisición de imágenes mediante fotografía digital de campos microscópicos y el procesamiento de las mismas mediante programas informáticos se realizaron en el Departamento de Anatomía Patológica del Hospital Gregorio Marañón de Madrid y en el Laboratorio de Neurobiología de la Audición del Departamento de Oftalmología y

Otorrinolaringología de la Facultad de Medicina Universidad Complutense de Madrid.

5. **DISEÑO EXPERIMENTAL**

El experimento se realizó en 16 especímenes que fueron divididos en tres grupos (Figura 6):

- **Grupo control (CON)** (n=6): Al que se le realizó el protocolo quirúrgico descrito anteriormente.
- **Grupo** sometido a **precondicionamiento isquémico (PCI)** (n=6): En este grupo, justo antes de la sección de los vasos pulmonares y el bronquio principal izquierdo para finalizar la neumonectomía, se realiza PCI mediante oclusión de la arteria pulmonar izquierda con una pinza protegida, durante dos períodos de cinco minutos, intercalando cinco minutos de reperusión entre ellos.
- **Grupo SHAM** (n=4): A este grupo de animales se les anestesió de la misma manera que en los otros dos grupos previos, se les realizó exclusivamente una toracotomía manteniendo ventilación bipulmonar.

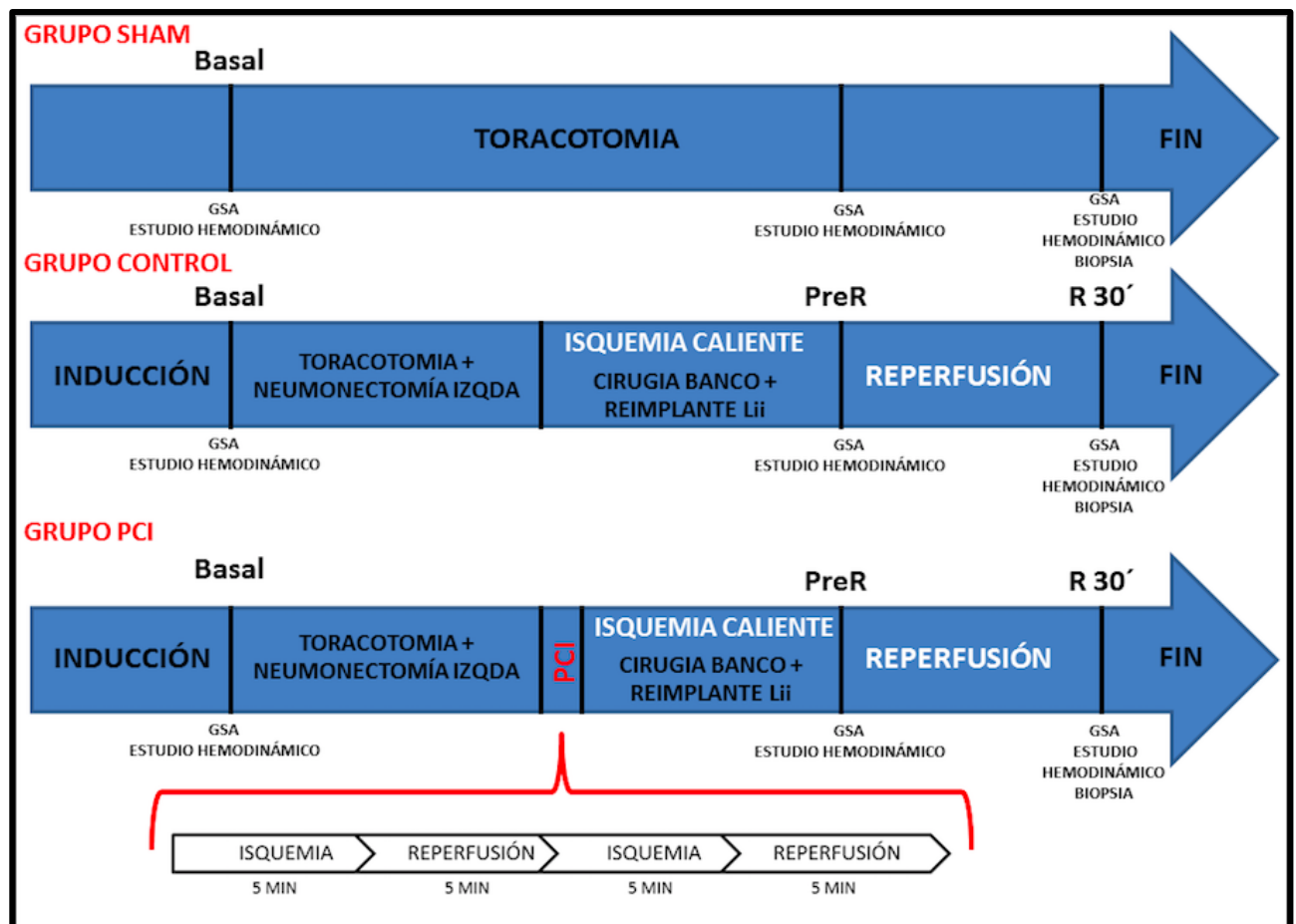


Figura 4: Representación esquemática del diseño experimental y momentos de medición y toma de muestras.

5.1. Mediciones y toma de muestras

Las mediciones y toma de muestras se realizan en 3 momentos del experimento (Figura 4):

- 1) Basal (BAS):** Se realiza gasometría de sangre arterial y se recogen variables hemodinámicas 30 minutos tras la realización de la toracotomía, momento en el cual el animal mantiene ventilación bipulmonar.

- 2) Pre-reperfusion (Pre-R):** Antes de reperfundir y ventilar el lóbulo caudal izquierdo, que ya ha sido reimplantado, se realiza nuevo estudio hemodinámico y gasometría arterial.
- 3) Tras 30 min de reperfusión (Rp-30'):** Pasados 30 minutos del restablecimiento del flujo sanguíneo se realiza nueva gasometría arterial, determinaciones hemodinámicas y se toma biopsia de tejido pulmonar.

En el grupo Sham, en el que no se realiza neumonectomía, las mediciones Pre-R se realizan 120 minutos tras la toracotomía y Rp-30', 30 minutos tras Pre-R.

5.2. Variables gasométricas

Todas las muestras de sangre arterial procedían de la arteria femoral. Se obtuvieron valores de presión arterial de oxígeno (PaO₂), de presión arterial de dióxido de carbono (PaCO₂) y de pH sanguíneo arterial.

5.3. Variables hemodinámicas

Mediante el catéter de la arteria femoral, se monitoriza de manera continua la tensión arterial invasiva, obteniéndose los valores de presión arterial sistólica (PAS), presión arterial diastólica (PAD) y presión arterial media (PAM).

Catéter de Swan-Ganz o catéter de la arteria pulmonar: Es un catéter que nos permite monitorizar de forma continua la presión media de la arteria pulmonar (PAPM) y la presión de enclavamiento o presión capilar pulmonar (PCP), que es equivalente a la presión en la aurícula izquierda. El catéter se introduce por la vena yugular derecha, posteriormente, una vez colocado correctamente, la luz proximal queda a nivel de la aurícula derecha, y la luz distal en la rama de la arteria pulmonar, y el inflado del balón en este momento producirá la determinación de presiones distales a éste (PCP).

La medición del gasto cardíaco y el índice cardíaco, se realiza mediante termodilución (a través de la diferencia de temperatura de un volumen de líquido (suero frío de volumen conocido) que inyectamos, entre la porción proximal y la punta del catéter, y mediante algoritmos matemáticos estima el gasto cardíaco y el índice cardíaco).

A través del catéter de la arteria pulmonar mediremos: la presión media de la arteria pulmonar (PAPM), así como la presión capilar pulmonar (PCP) e índice cardíaco (IC).

5.4. Obtención de muestras de tejido pulmonar y procesamiento

Las muestras fueron tomadas del lóbulo caudal del pulmón izquierdo (que es el reimplantado) a los 30 minutos de iniciar la reperfusión. Inmediatamente

después de su obtención, las muestras se fijan en una solución de paraformaldehído al 4% en PBS 0,1M pH 7,4. Posteriormente se procede a su inclusión en bloques de parafina para su seccionado (microtomo Leica RM 2135) en cortes de 4µm de grosor. Los cortes obtenidos fueron distribuidos, de manera seriada, en portaobjetos de vidrio. Se desparafinan con xileno y se rehidratan utilizando alcoholes de graduación sucesiva (100°-95°-70°), tras lo cual se lavan con agua destilada.

5.4.1. Tinción hematoxilina-eosina

Tras la toma de muestras y su procesamiento inicial, se tiñen con hematoxilina-eosina. Esta tinción es el método de rutina más utilizado en histología que permite distinguir detalles morfológicos de células y tejidos. Las características de sus compuestos hacen posible la visualización al microscopio óptico las células y sus núcleos, que se tiñen de forma diferenciada.

- **Descripción de la técnica:**

Se realiza la técnica mediante el **método de Harris**, que comprende los siguientes pasos:

- ✓ Los portas se colocan en cestillos que se introducen durante 8-15 minutos en la solución de hematoxilina de Harris.
- ✓ Se lava el exceso de hematoxilina con agua corriente.

- ✓ Se diferencian con una mezcla de ácido hidrociorhídrico al 1% y etanol 70% durante 5 o 10 segundos.
- ✓ Se aclaran con agua.
- ✓ Se azulean las preparaciones durante 30 o 90 segundos en una solución de amoniaco débil o en una solución de carbonato de litio.
- ✓ Lavado con agua 5 o 10 minutos.
- ✓ Se introducen durante un período entre 15 segundos y 3 minutos en la solución de eosina.
- ✓ Se deshidratan en etanol al 70°, 95° y 100° posteriormente.
- ✓ Finalmente se introducen en xileno durante 10 minutos y se montan.

- **Examen de las muestras y cuantificación**

Los cambios histológicos detectados mediante microscopía óptica en biopsias pulmonares tras IR pulmonar y tras trasplante descritas en la literatura científica incluyen: destrucción de la arquitectura alveolar, edema intersticial, congestión, exudación de eritrocitos al espacio alveolar, aparición de membranas hialinas a lo largo de las paredes alveolares, infiltrado leucocitario en vasos e intersticio pulmonar y desunión entre células endoteliales y entre neumocitos (21) (24) (80,81) (82).

En base a lo anterior, determinaremos en cada muestra:

1. Presencia de infiltrado inflamatorio: se excluyen los campos con denso componente inflamatorio de probable etiología infecciosa. La ausencia total

de infiltrado inflamatorio se clasifica como 0. En caso de existir inflamación, se describen los distintos tipos de células que lo componen:

- Monocito-macrófagos.
- Neutrófilos.
- Linfocitos.

2. Edema: se valora la presencia de edema por el nivel de ensanchamiento de los septos alveolares e interlobares.

3. Congestión: se valora la presencia de capilares alveolares o vasos de pequeño calibre dilatados y rellenos de hematíes.

Cada uno de los parámetros es analizado según un sistema de puntuación semi-cuantitativo valorando la severidad de la lesión mediante una escala del 0-3:

- 0: Inexistente
- 1: leve
- 2: Moderado
- 3: Severo

5.4.2. Técnicas inmunohistoquímicas

Las técnicas inmunohistoquímicas (IHQ), permiten la identificación y localización de compuestos o radicales químicos en células y tejidos mediante la utilización de anticuerpos. Se basan en la capacidad que tienen los anticuerpos para reconocer a moléculas y unirse a ellas. Además, la conjugación o combinación de los

anticuerpos con enzimas o con sustancias fluorescentes permite detectar cantidades ínfimas de moléculas presentes en el tejido. Es un método selectivo y más resolutivo que la histología convencional, con alto grado de sensibilidad y especificidad, así como con una relativa sencillez de ejecución. Además, nos permite comparar resultados de muestras procesadas con diferentes tinciones o anticuerpos. Consideramos que la utilización de estas técnicas puede ser de gran utilidad en el acercamiento diagnóstico a este tipo de patología.

El objetivo de la técnica inmunohistoquímica es detectar, amplificar y hacer visible un antígeno determinado. Para la detección específica se emplean anticuerpos dirigidos especialmente contra el antígeno celular buscado (es el llamado “anticuerpo primario”). Para amplificarlo se emplean también anticuerpos, dirigidos contra el anticuerpo primario (son los llamados “anticuerpos secundarios”). Finalmente, para visualizar el conjunto se emplea una combinación de Avidina, biotina y peroxidasa que permite, mediante una simple reacción química local, colorear y hacer visible al microscopio la cadena de anticuerpos. Es preciso inhibir la peroxidasa endógena previo a la tinción, mediante el lavado con peróxido de hidrógeno.

- **Descripción de la técnica:**

El procesamiento inicial de las muestras para la IHQ es similar al que se sigue para la tinción rutinaria con hematoxilina-eosina.

El estudio de la existencia de los diferentes antígenos presentes en las muestras, se realizó mediante detección IHQ de visualización indirecta con anticuerpo secundario (Ac-II) biotinilado. Los Ac primarios (Ac-I) específicos elegidos para el presente estudio fueron:

- Anti-Bcl-2 (1:100, Novus Biologicals, 8C8, monoclonal, hecho en ratón).
- Anti-Caspasa 9 (1:100, Biorbyt, orb1677, policlonal, hecho en conejo).
- Anti-MCP1 (1:100, MyBioSource, MBS2027425, policlonal, hecho en conejo).
- Anti-CD 68 (1:100, MyBiosource MBS370038, Monoclonal hecho en ratón).

Para ello, tras la hidratación de los cortes de parafina, se realizó una inhibición de las peroxidasas endógenas del tejido mediante la incubación de las muestras durante unos minutos con peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Posteriormente, se realizó otra incubación con el suero del animal del que se extrae el Ac-II, para evitar su unión inespecífica en el tejido, junto con un detergente (Tritón-X100, Sigma-Aldrich) para permeabilizar la membrana plasmática y permitir el acceso de los productos al interior de la célula.

La detección del Ag deseado se realiza mediante la incubación de la muestra con el Ac-I específico (24h, 4°C y oscuridad), tras lo cual, las muestras se lavaron con PBS (0.1M, pH 7.4) y se incubaron con el Ac-II biotinilado (1:200, 1h, temperatura ambiente y oscuridad). El Ac-II se unirá específicamente al Ac-I para amplificar la reacción Ag-Ac-I.

Los Ac-II están biotinilados para permitir la unión de estos con el complejo avidina-biotina. Este complejo contiene una peroxidasa, que cataliza la liberación de oxígeno, a partir de H_2O_2 , que afectará a un sustrato oxidable, la diaminobencidina (DAB), incluida en la última solución de incubación del proceso. La DAB oxidada es insoluble en agua y precipita sobre el complejo Ag-Ac. Así, el precipitado resultante de este proceso, de color marrón-rojizo, evidencia la reacción Ag-Ac en el tejido y por tanto hace patente la localización del antígeno en la célula.

Las secciones fueron estudiadas (al igual que las teñidas con HE), utilizando un fotomicroscopio (Leica Leitz DMRB), conectado a una cámara (Nikon DS-F1) y el programa NIS-Elements F de captura de imágenes (Figura 5).

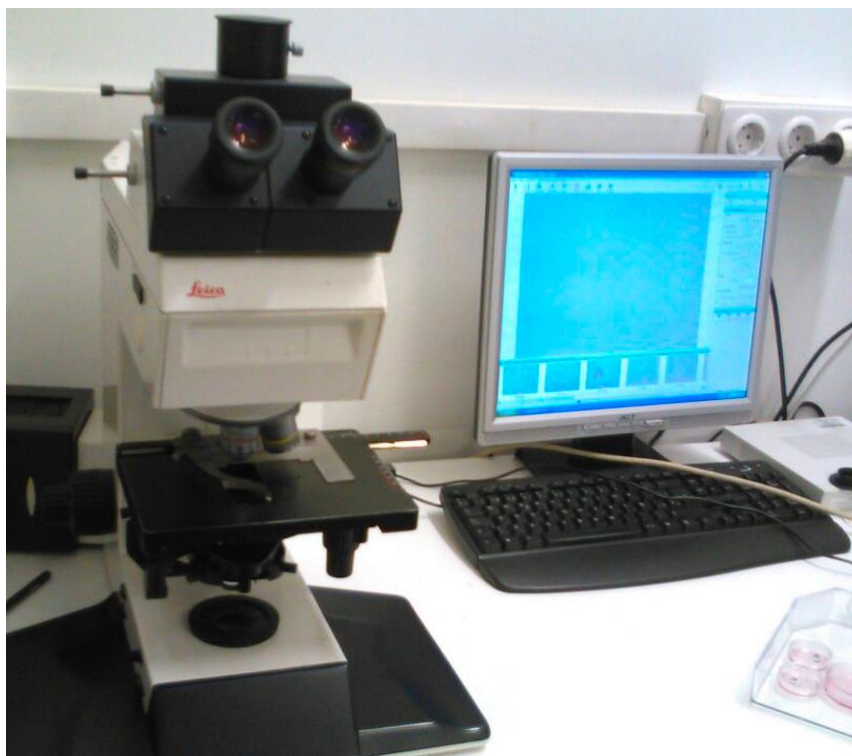


Figura 5: Fotomicroscopio Leica, Leitz cámara y programa NIS-Elements F.

- **Visualización y métodos de cuantificación:**

Para la presentación de resultados de las tinciones IHQ (CD68, MCP-1, caspasa-9 y bcl-2) se realiza un estudio descriptivo y un estudio analítico de las variables cuantitativas (Bcl-2, CD68 y MCP-1) y semicuantitativas (caspasa9).

a) Estudio descriptivo de las tinciones inmunohistoquímicas:

Para cada anticuerpo del estudio se describirá la tinción de la muestra pulmonar considerando en qué tipo celular prevalece la tinción, la localización citoplasmática, nuclear o mixta de ésta y la intensidad de la tinción.

c) Análisis estadístico de la expresión inmunohistoquímica de caspasa-9:

De cada muestra de pulmón se fotografiaron diez campos de gran aumento (40 aumentos, equivalente a $0,035\text{mm}^2$) eligiendo áreas de predominio alveolar, evitando zonas de desestructuración o hemorrágicas. Se fotografian campos no solapados, obteniéndose un área total fotografiada de $0,35\text{mm}^2$.

Dos observadores independientes y desconocedores del origen de la muestra, con ayuda del programa informático ImageJ (versión 1.51j8), asignaron a cada campo seleccionado un porcentaje de células neumocitarias teñidas respecto al conjunto de neumocitos que se distinguen en todas las paredes alveolares del campo. Este porcentaje se transformó en una variable semicuantitativa de la siguiente forma:

0= ausencia de tinción

1=tinción en menos del 50% de las células

2=tinción en más del 50% de las células

En caso de discrepancia, los dos observadores revisaron la muestra para alcanzar un acuerdo. Se le asignó a cada muestra pulmonar (correspondiente a un experimento) el valor de la mediana de los valores de los diez campos observados. Se consideró tinción celular positiva a cualquier grado de tinción, difusa o granular, citoplasmática o nuclear, en células claramente diferenciables, y el recuento de células neumocitarias se realizó mediante conteo de sus núcleos.

d) Análisis de la expresión inmunohistoquímica de CD68, MCP-1 y Bcl-2:

De cada muestra de pulmón se fotografiaron diez campos de gran aumento (40x) eligiendo áreas de predominio alveolar, evitando zonas desestructuradas o hemorrágicas.

Dos observadores, independientes y desconocedores del origen de la muestra, contaron, con ayuda del programa informático ImageJ 1.51j8, el número de células teñidas en cada campo. En caso de discrepancia, los dos observadores revisaron la muestra para alcanzar un acuerdo. Se le asignó a cada muestra pulmonar (correspondiente a un experimento) el valor de la media de los valores de los diez campos observados. Sólo se contaron aquellas células claramente individualizables y con tinción claramente positiva citoplasmática o nuclear.

5.5. Análisis de los datos y tratamiento estadístico

Con todos los datos clínicos y de laboratorio registrados se confeccionó una base de datos con el programa IBM_SPSS_Statistics_24 para MAC. Las variables cualitativas y semicuantitativas (*grado e inflamación, tipo de célula inflamatoria, grado de edema y grado de congestión*) se expresan con la frecuencia (porcentaje). Las cuantitativas se presentan como media (error típico) cuando siguen una distribución normal.

En lo que respecta al análisis de las variables semicuantitativas, éstas son tratadas como variables cualitativas, empleando el test de Chi-cuadrado para detectar diferencias entre grupos de estudio. Los resultados son expresados en una tabla de contingencia.

Para identificar las diferencias significativas entre los grupos en las variables cuantitativas, se utilizó el Test de Kruskal-Wallis (la hipótesis nula fue rechazada para un valor de $\alpha=0,05$). Posteriormente, para analizar los pares de muestras específicos y encontrar diferencias significativas fue usado el Test de la U de Mann-Whitney. La significación estadística fue establecida con $p < 0,05$.

RESULTADOS

VARIABLES GENERALES

En el estudio realizado, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos Sham, Control (CON) y el grupo sometido a PCI (PCI) en cuanto al peso de los animales y duración total del procedimiento. Tampoco se hallaron diferencias significativas entre los grupos CON y PCI en relación al tiempo de isquemia pulmonar (tabla 3).

Tabla 3: Peso y tiempos quirúrgico y de isquemia de los animales del estudio.

Variable	Grupo	Valor
Peso (kg)	CON	40 (7)
	PCI	33 (8)
	SHAM	37 (6)
Tiempo de isquemia (min)	CON	107 (19)
	PCI	107 (9)
	SHAM	
Tiempo total intervención (min)	CON	295 (35)
	PCI	300 (14)
	SHAM	292 (19)

Resultados: media (DE). CON: grupo control. PCI: grupo preconditionamiento isquémico. SHAM: grupo de cirugía simulada.

RESULTADOS GASOMÉTRICOS

Se determinan los valores PaO₂, PaCO₂ y PH extraídos de sangre periférica arterial a través del catéter femoral (tabla 4).

Tabla 4: Variables obtenidas de la gasometría arterial

VARIABLE	GRUPO	BASAL	Pre-R	30'Rp
PO ₂	CON	388 (69)	302 (48)	297 (49)
	PCI	384 (50)	420 (31)	351 (44)
	SHAM	409 (28)	417 (44)	428 (34)
PCO ₂	CON	34 (2)	42 (3)	44 (5)
	PCI	39 (4)	37 (2)	45 (6)
	SHAM	32 (3)	44 (8)	34 (1)
PH	CON	7,5 (0,03)	7,45 (0,02)	7,45 (0,03)
	PCI	7,4 (0,02)	7,47 (0,02)	7,46 (0,02)
	SHAM	7,5 (0,03)	7,53 (0,04)	7,51 (0,03)

Los resultados se expresan como la media (error típico). CON: grupo control. PCI: grupo preconditionamiento isquémico. SHAM: grupo de cirugía simulada.

Los valores de PaO₂ sufren discretas variaciones a lo largo del procedimiento, no observándose diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.

La medición de la PCO₂ en sangre arterial periférica muestra valores fisiológicos y gran estabilidad en los diferentes momentos del procedimiento. No se encontraron diferencias significativas al comparar los diferentes grupos entre sí. En cuanto al PH arterial, se mantiene en niveles fisiológicos a lo largo de todo el procedimiento, sin existir diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.

RESULTADOS HEMODINÁMICOS

El análisis estadístico de los valores de frecuencia cardíaca, presión arterial media, presión media de arteria pulmonar, presión capilar pulmonar e índice cardíaco, se mantuvieron dentro de los límites de la normalidad, no encontrándose diferencias estadísticamente significativas entre los grupos (tabla 5).

Tabla 5: Variables hemodinámicas

VARIABLE	GRUPO	BASAL	Pre-R	30´Rp
PAM (mmHg)	CON	99 (4)	97,16 (10,10)	86,5 (15,90)
	PCI	91 (1)	105 (5,79)	89,83 (18,60)
	SHAM	91 (8)	95,75 (19,18)	94,5 (14,82)
FC (latidos/min)	CON	86 (5)	88,33 (29,61)	92,66 (32,14)
	PCI	96 (8)	87,33 (22,56)	101,5 (31,48)
	SHAM	106 (7)	115,5 (25,90)	113,25 (26,42)
IC (Lmin/m2)	CON	5,2 (0,6)	4,5 (1,35)	4,83 (1,70)
	PCI	6,2 (0,4)	5,38 (0,82)	5,91 (1,75)
	SHAM	5,8 (0,8)	5,95 (1,51)	5,62 (0,97)
PAPM (mmHg)	CON	22,5 (0,8)	22,5 (2,07)	22,33 (1,86)
	PCI	21,1 (0,9)	21,16 (2,31)	22,33 (1,50)
	SHAM	23,5 (0,6)	23,50 (1,29)	23,25 (0,95)
PCP (mmHg)	CON	11,6 (1,1)	12,5 (2,34)	13 (3,94)
	PCI	11 (0,3)	12,16 (1,72)	12,16 (2,04)
	SHAM	11,2 (0,4)	11,00 (0,81)	14,00 (1,41)

Los resultados se expresan como media (error típico). PAM: presión arterial media. FC: frecuencia cardíaca. IC: índice cardíaco. PAPM: presión media en arteria pulmonar. PCP: presión capilar pulmonar. B: basal. PRp: pre reperfusión. 30´Rp: a los 30 minutos post reperfusión. CON: grupo control. PCI: grupo preconditionamiento isquémico. SHAM: grupo de cirugía simulada

RESULTADOS HISTOPATOLÓGICOS: TINCIÓN HEMATOXILINA-EOSINA

1. Estudio descriptivo

Para la descripción de los cambios de las muestras de tejido pulmonar de biopsias extraídas a los 30 minutos de la reperfusión, elegimos zonas centrales de predominio alveolar. Se observa en las muestras de tejido de los animales del grupo sometido a IR (CON), signos de congestión vascular y presencia de moderado infiltrado inflamatorio de predominio mononuclear o macrofágico (aunque también se observa infiltrado linfocitario en algunos campos), así como extravasación de hematíes a la luz alveolar (Figuras 6-8).

Podemos observar una gran similitud entre las muestras del grupo de cirugía simulada (SHAM) (Figura 9), al que no se le somete a IR, y las preparaciones correspondientes a los experimentos sometidos a tratamiento con PCI (Figura 10), en los que se observa una arquitectura pulmonar prácticamente conservada, y con mínima o nula reacción inflamatoria o congestión.

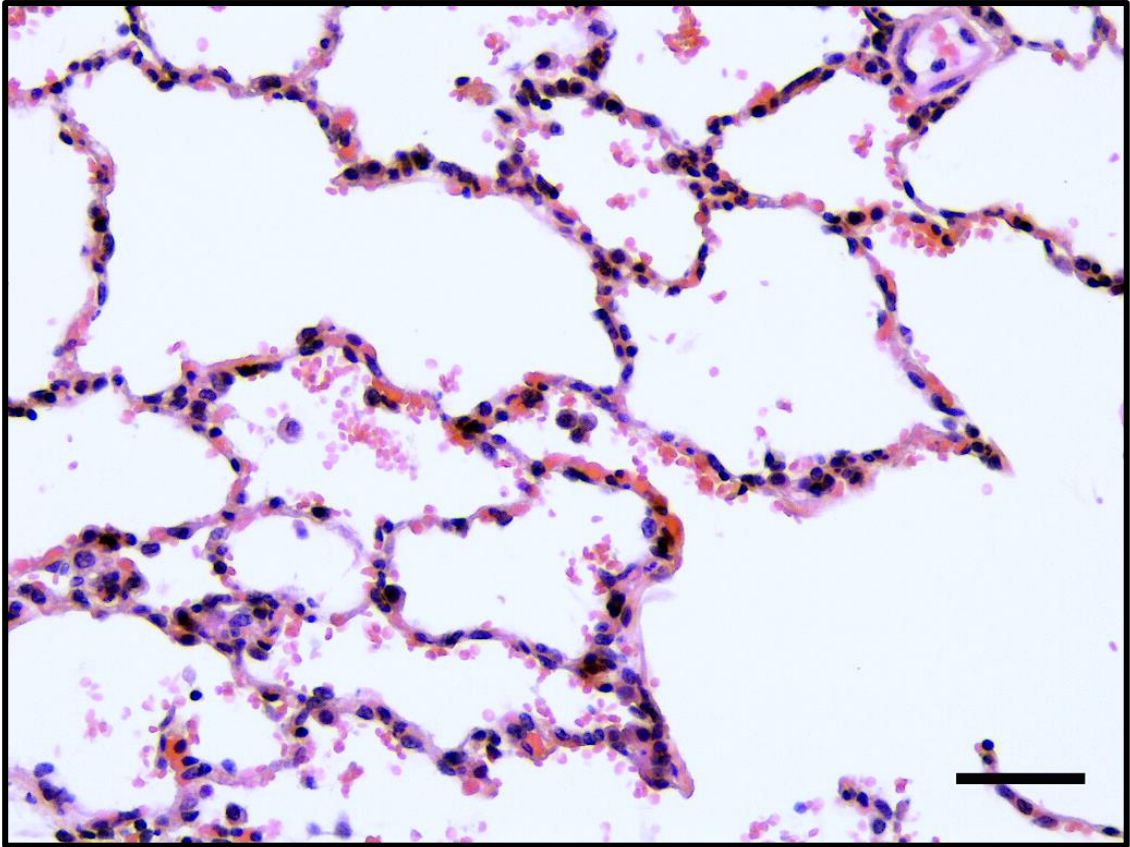


Figura 6: Correspondiente al grupo control (CON). Se observa un área de parénquima pulmonar periférico a 20x aumentos, con estructuras alveolares, algunas dilatadas, con tabiques alveolares con moderada congestión capilar. (Barra de escala: 50 micras).

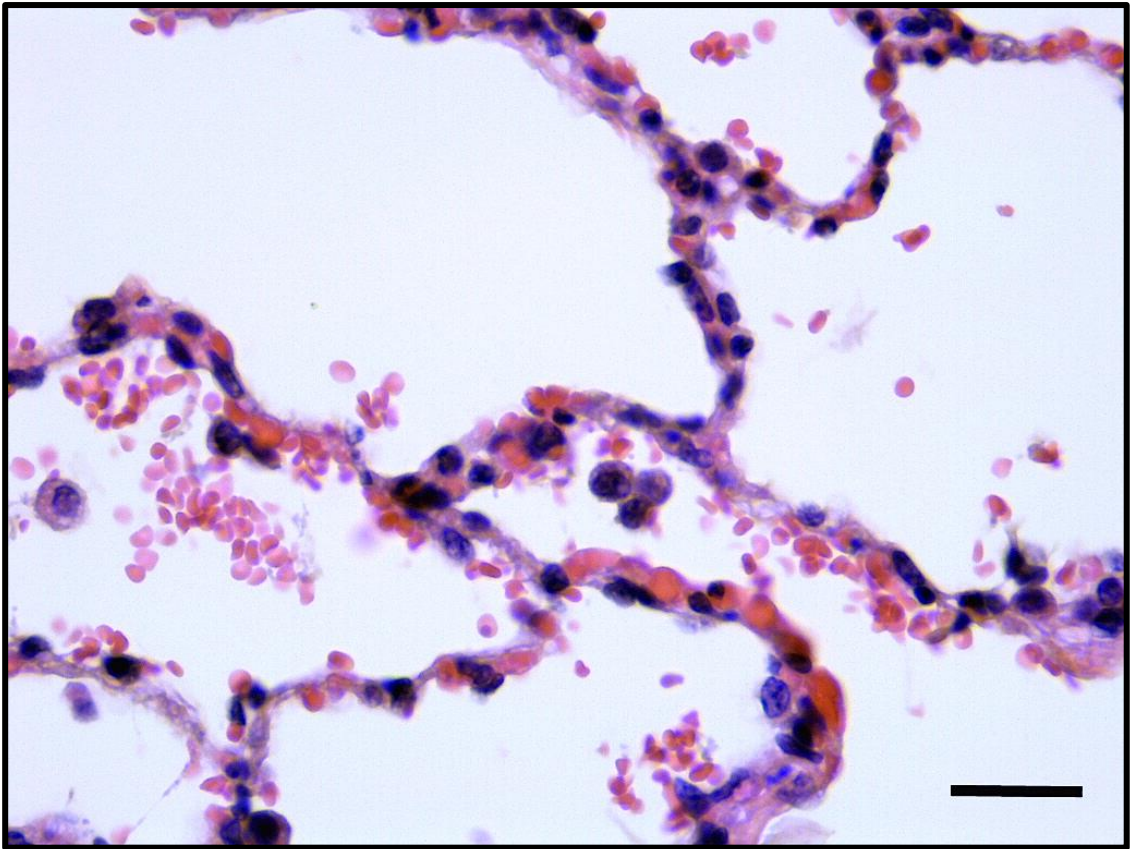


Figura 7: Detalle de la imagen 11 a 40x aumentos. Se aprecia a gran aumento la presencia de hematíes en espacios alveolares y macrófagos en tabiques y espacios alveolares. (Barra de escala: 30 micras).

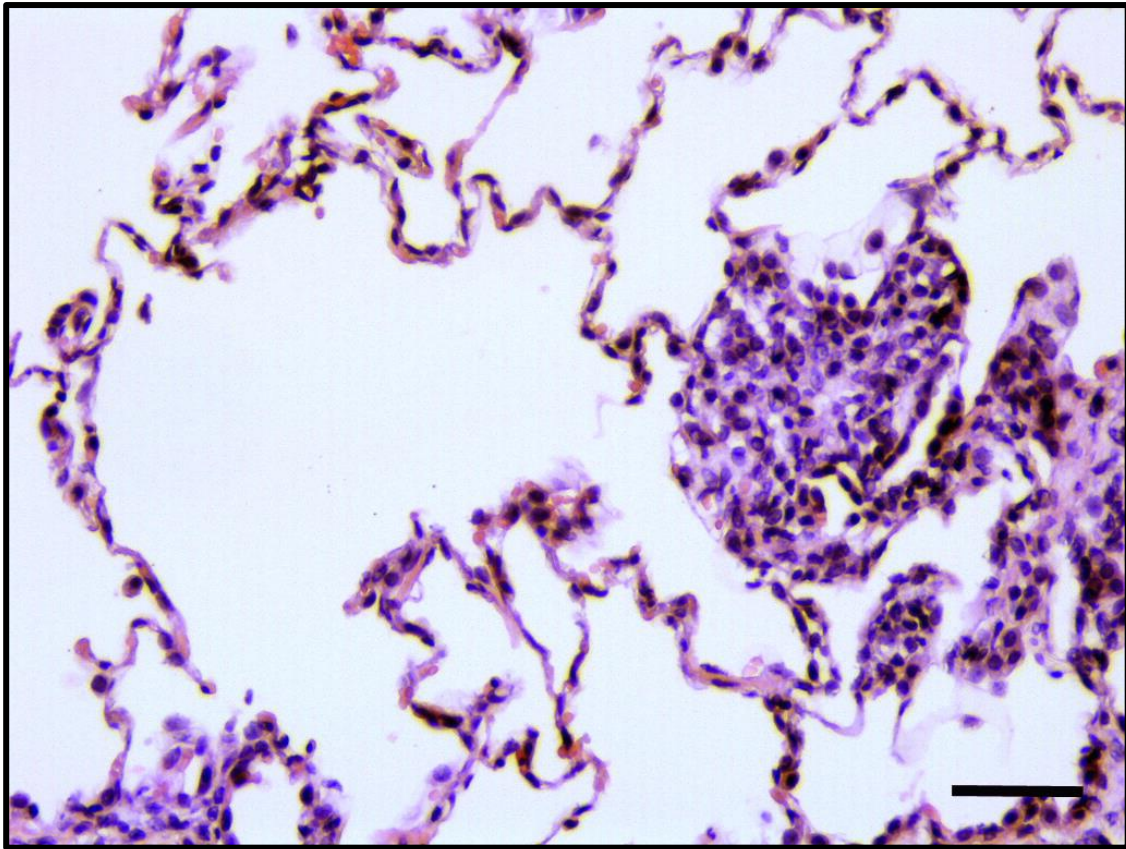


Figura 8: Imagen correspondiente al grupo CON (control). Parénquima pulmonar periférico a 20x con estructuras alveolares, algunas dilatadas, con presencia de un moderado infiltrado inflamatorio de predominio linfocitario en el que se reconocen algunos histiocitos principalmente en el intersticio pulmonar y en la pared de los alveolos. También se observa algún macrófago intraalveolar. (Barra de escala: 50 micras).

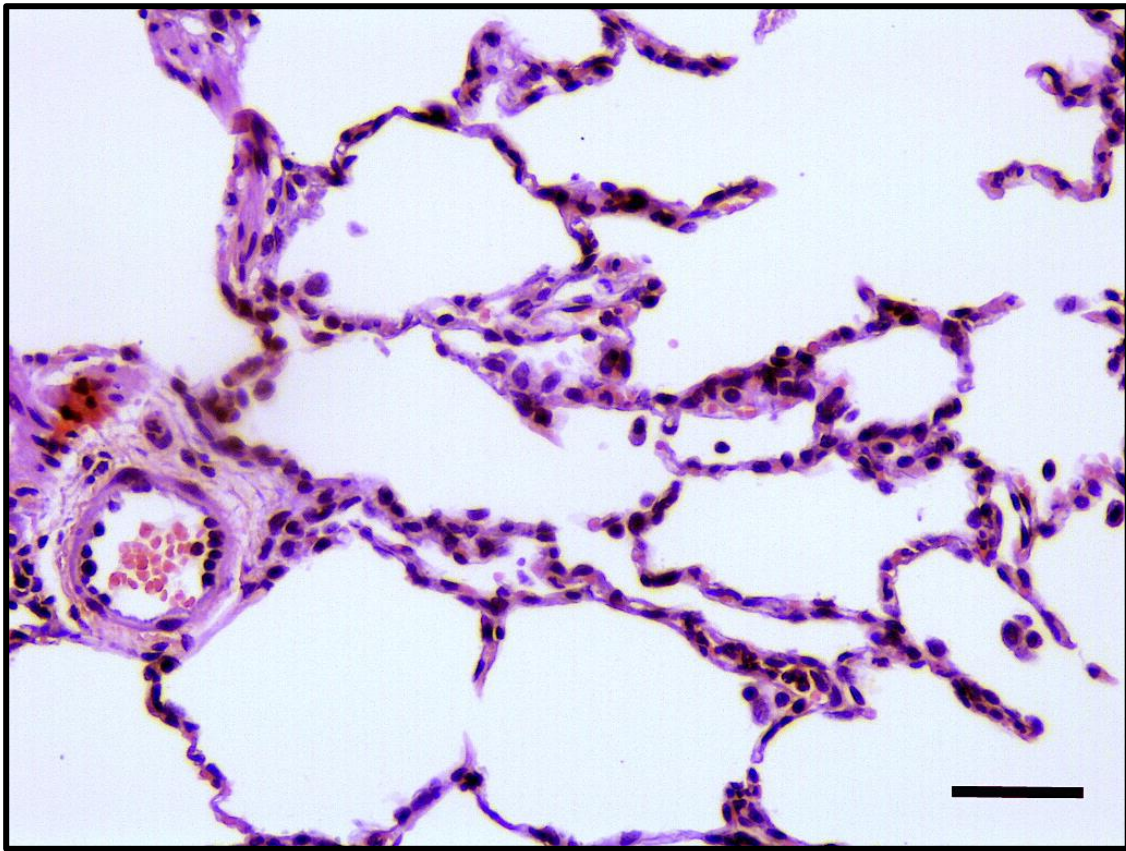


Figura 9: (Correspondiente al grupo SHAM). Parénquima pulmonar periférico a 20x constituido por tabiques alveolares, en los que se identifican núcleos de neumocitos y capilares. Se observa un tabique intersticial donde se observa un vaso con contenido hemático. En el interior de los alveolos se observa la presencia de algún elemento inflamatorio descamado, de tipo mononuclear o macrófago. (Barra de escala: 50 micras).

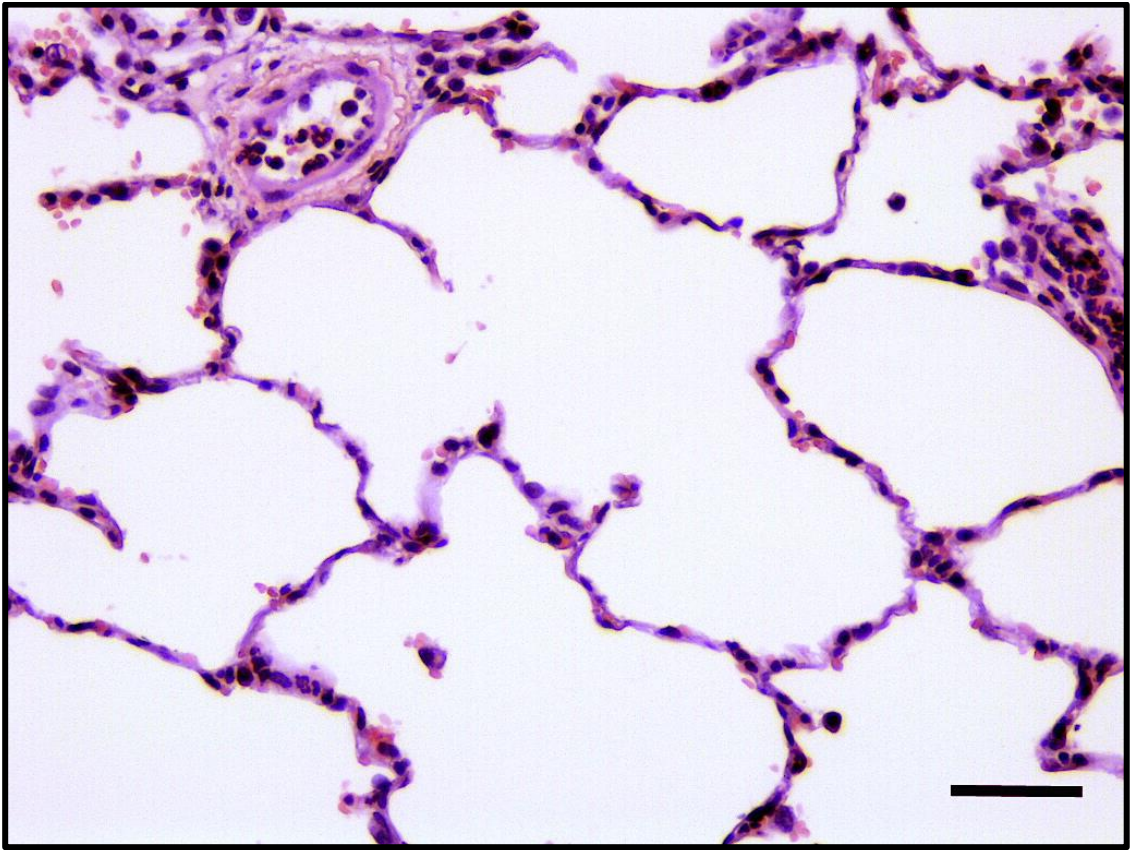


Figura 10: (Correspondiente al grupo PCI). Campo de parénquima pulmonar periférico a 20x con presencia de una estructura vascular con algunos hematíes y células inflamatorias en su interior. Se identifican tabiques alveolares en los que se distinguen núcleos de neumocitos y luces capilares colapsadas sin signos de congestión, observándose en su interior uno o dos hematíes. (Barra de escala 50 micras).

2. Análisis estadístico hematoxilina-eosina:

Grado de inflamación e infiltración por monocito-macrófagos:

En el estudio con microscopía óptica de las muestras pulmonares teñidas con hematoxilina-eosina, se observa que el SIR indujo en el tejido pulmonar una reacción inflamatoria a los 30 minutos de la reperfusión, significativa con respecto al grupo simulado SHAM (no sometido a IR) (CON vs SHAM, $p=0,018$). La célula que predomina en el infiltrado inflamatorio de los tejidos sometidos a IR son los macrófagos, que son estadísticamente más abundantes que en grupo SHAM (CON vs SHAM, $p=0,012$). Cuando se realiza pre-tratamiento a los animales con PCI, previo a la IR pulmonar, podemos observar a los 30 minutos, una disminución de la inflamación con respecto al grupo control (PCI vs CON, $p=0,03$) y de infiltrado macrofágico con respecto al grupo control (PCI vs CON, $p=0,011$). Las diferencias entre el grupo PCI y SHAM no han sido estadísticamente significativas (tabla 6, tabla 7) (figura 11, figura 12).

Tabla 6: Tabla de frecuencias de casos y su porcentaje por grupo según el grado de inflamación pulmonar observada mediante tinción hematoxilina-eosina a los 30 minutos de la reperusión.

GRUPO	GRADO DE INFLAMACIÓN	Frecuencia	Porcentaje
SHAM	Nada	3	75,0%
	Leve	1	25,0%
	Moderado	0	0,0%
	Severo	0	0,0%
CON	Nada	0	0,0%
	Leve	3	50,0%
	Moderado	3	50,0%
	Severo	0	0,0%
PCI	Nada	2	33,3%
	Leve	4	66,7%
	Moderado	0	0,0%
	Severo	0	0,0%

CON: grupo control. PCI: grupo preconditionamiento isquémico. SHAM: grupo de cirugía simulada. Inflamación: CON vs SHAM, $p = 0,018$. PCI vs CON, $p = 0,03$.

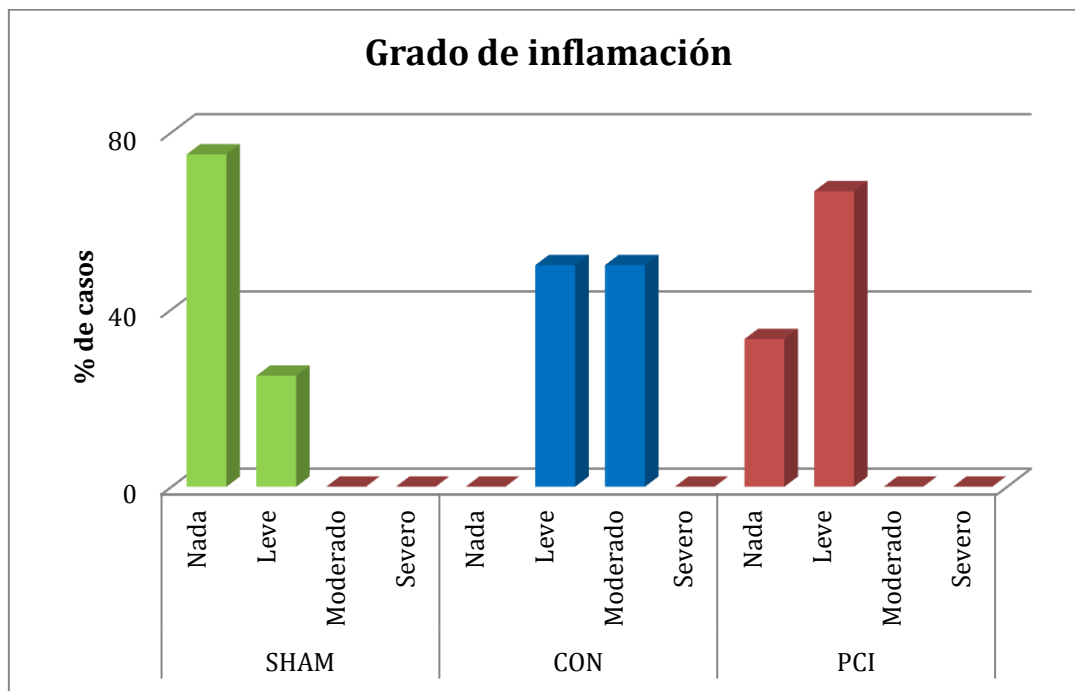


Figura 11: Distribución de frecuencia, porcentaje dentro del grupo, del grado de inflamación en tejido pulmonar. CON: grupo control. PCI: grupo preconditionamiento isquémico. SHAM: grupo de cirugía simulada.

Tabla 7: Tabla de frecuencias de casos y su porcentaje por grupo según el grado de infiltración pulmonar por monocitos/macrófagos observada mediante tinción hematoxilina-eosina a los 30 minutos de la reperusión.

GRUPO	GRADO DE INFILTRACIÓN POR MONOCITO-MACRÓFAGOS	Frecuencia	Porcentaje
SHAM	Nada	3	75,0%
	Leve	1	25,0%
	Moderado	0	0,0%
	Severo	0	0,0%
CON	Nada	0	0,0%
	Leve	3	50,0%
	Moderado	3	50,0%
	Severo	0	0,0%
PCI	Nada	4	66,7%
	Leve	2	33,3%
	Moderado	0	0,0%
	Severo	0	0,0%

CON: grupo control. PCI: grupo preconditionamiento isquémico. SHAM: grupo de cirugía simulada. Grado de infiltración por monocito-macrófagos: CON vs SHAM, $p = 0,012$. PCI vs CON, $p = 0,011$.

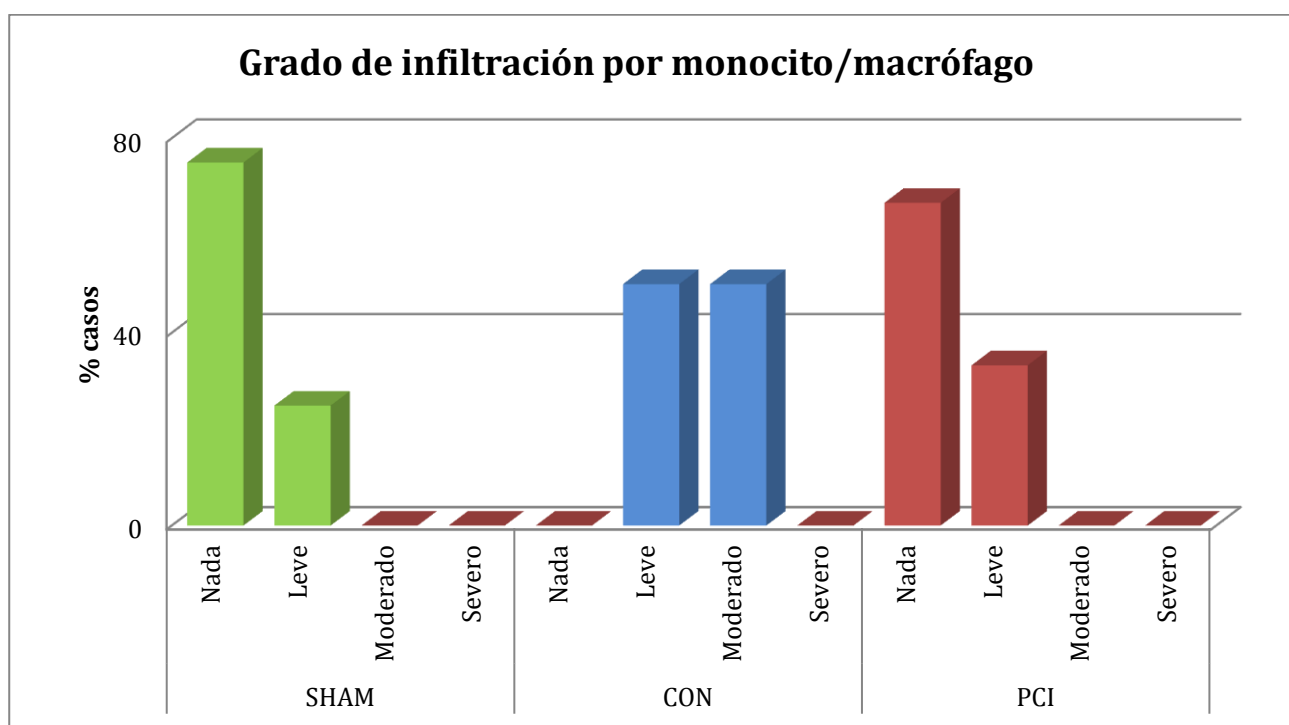


Figura 12: Distribución de frecuencias, en porcentaje dentro del grupo, del grado de infiltración por monocito-macrófagos en tejido pulmonar. CON: grupo control. PCI: grupo preconditionamiento isquémico. SHAM: grupo de cirugía simulada.

Grado de infiltración por linfocitos y PMN:

Respecto al grado de infiltración del tejido pulmonar por linfocitos y PMN, no se observaron diferencias significativas entre los tres grupos del estudio (tabla 8).

Tabla 8: Tabla de frecuencias de casos y su porcentaje por grupo según el grado de infiltración pulmonar por linfocitos y PMN (polimorfonucleares) observada mediante tinción hematoxilina-eosina a los 30 minutos de la reperusión.

GRUPO	GRADO	LINFOCITOS		PMM	
		N	P	N	P
SHAM	Nada	3	75,00%	4	100,00%
	Leve	1	25,00%	0	0,00%
	Moderado	0	0,00%	0	0,00%
	Severo	0	0,00%	0	0,00%
CON	Nada	4	66,70%	4	66,70%
	Leve	2	33,30%	2	33,30%
	Moderado	0	0,00%	0	0,00%
	Severo	0	0,00%	0	0,00%
PCI	Nada	3	50,00%	3	50,00%
	Leve	3	50,00%	3	50,00%
	Moderado	0	0,00%	0	0,00%
	Severo	0	0,00%	0	0,00%

CON: grupo control. PCI: grupo preconditionamiento isquémico. SHAM: grupo de cirugía simulada. PMN: polimorfonucleares. N: número de casos en el grupo. P: porcentaje de casos en el grupo.

Grado de edema intersticial y congestión capilar:

Respecto al grado de edema intersticial y de congestión capilar en el tejido pulmonar, no se observaron diferencias significativas entre los tres grupos del estudio (tabla 9).

Tabla 9: Tabla de frecuencias de casos y su porcentaje por grupo según el grado de edema y congestión pulmonar observada mediante tinción hematoxilina-eosina a los 30 minutos de la reperusión.

GRUPO	GRADO	EDEMA		CONGESTIÓN	
		N	P	N	P
SHAM	Nada	2	50,00%	3	75,00%
	Leve	2	50,00%	1	25,00%
	Moderado	0	0,00%	0	0,00%
	Severo	0	0,00%	0	0,00%
CON	Nada	2	33,30%	2	33,30%
	Leve	2	33,30%	1	16,70%
	Moderado	2	33,30%	1	16,70%
	Severo	0	0,00%	2	33,30%
PCI	Nada	2	33,30%	2	33,30%
	Leve	4	66,70%	4	66,70%
	Moderado	0	0,00%	0	0,00%
	Severo	0	0,00%	0	0,00%

CON: grupo control. PCI: grupo preconditionamiento isquémico. SHAM: grupo de cirugía simulada. N: número de casos en el grupo. P: porcentaje de casos en el grupo.

RESULTADOS INMUNOHISTOQUÍMICOS

1. TINCIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA CON CD68

1.1. Estudio descriptivo:

Con este anticuerpo identificamos células de estirpe monocito-macrofágica, que adquieren tinción citoplasmática de aspecto granular, ya que es una proteína de la membrana citoplasmática, y que se encuentran presentes tanto en pared alveolar, en interior de los vasos (Figura 11), en luz alveolar (Figura 12) e intersticio (Figura 13) (Figura 14).

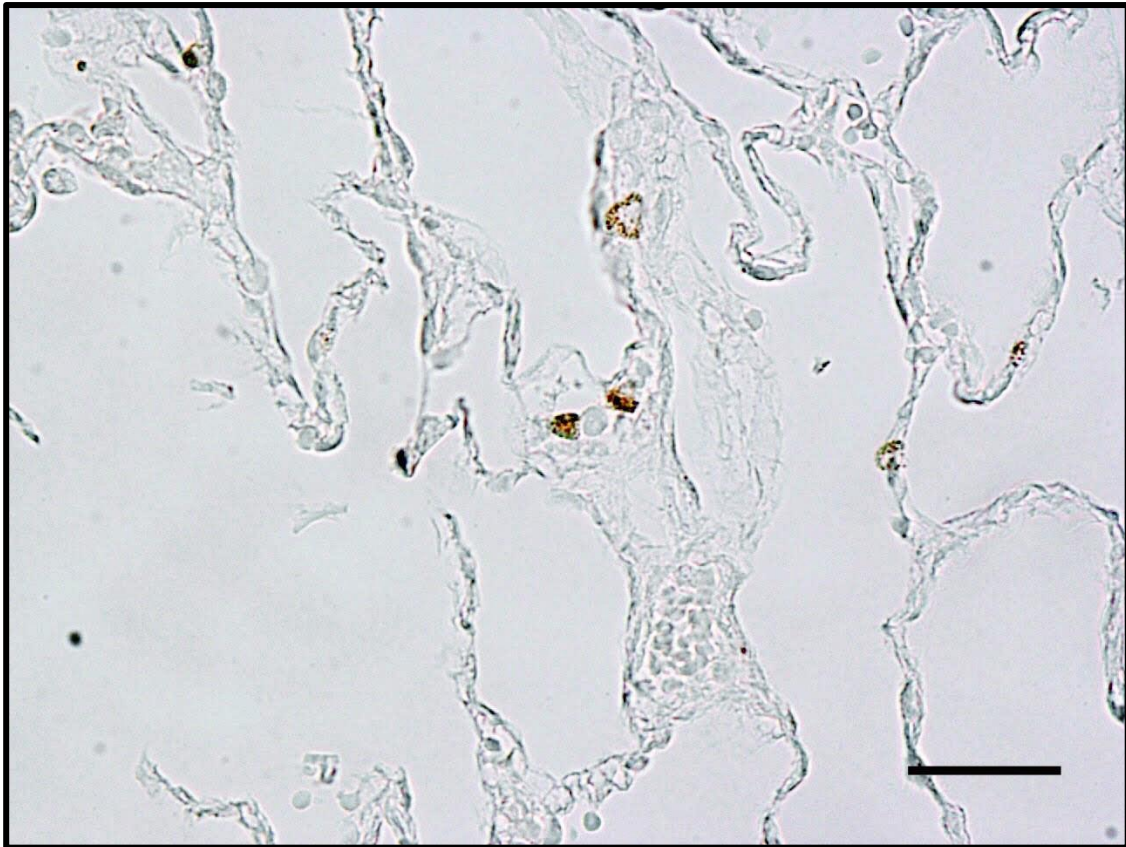


Figura 11: Grupo CON: correspondiente al grupo control, podemos observar un campo de parénquima pulmonar periférico a 40X aumentos, con presencia tabiques alveolares en los que se identifican macrófagos, así como en el interior de vasos, con tinción citoplasmática granular positiva para CD68.

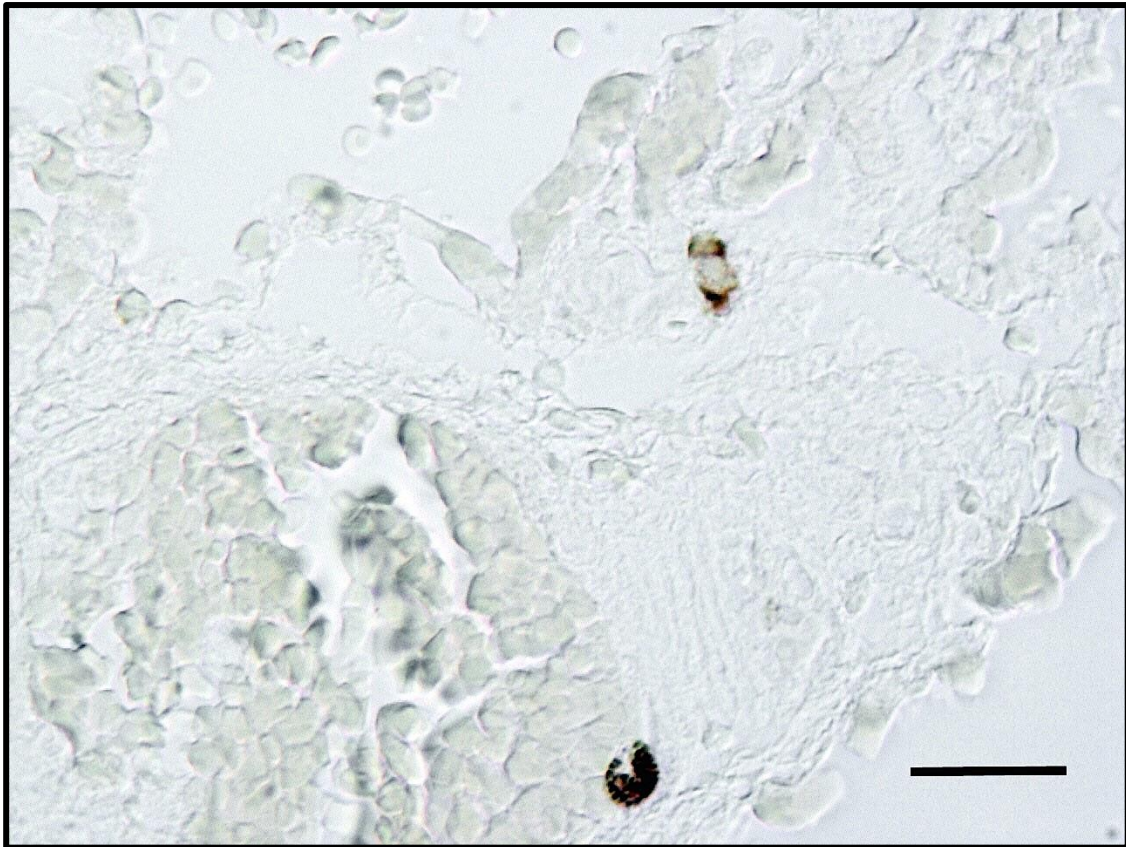


Figura 12: Tinción IHQ en campo de 63X aumentos para CD68, también perteneciente al grupo control. Podemos ver un campo de intersticio pulmonar en el que se identifican claramente dos macrófagos y se aprecia con detalle la tinción citoplasmática granular intensa para CD68. El de la zona inferior de la imagen, probablemente localizado en el interior de un vaso y el de la parte superior probablemente localizado en el intersticio pulmonar. (Barra de escala. 10 micras).

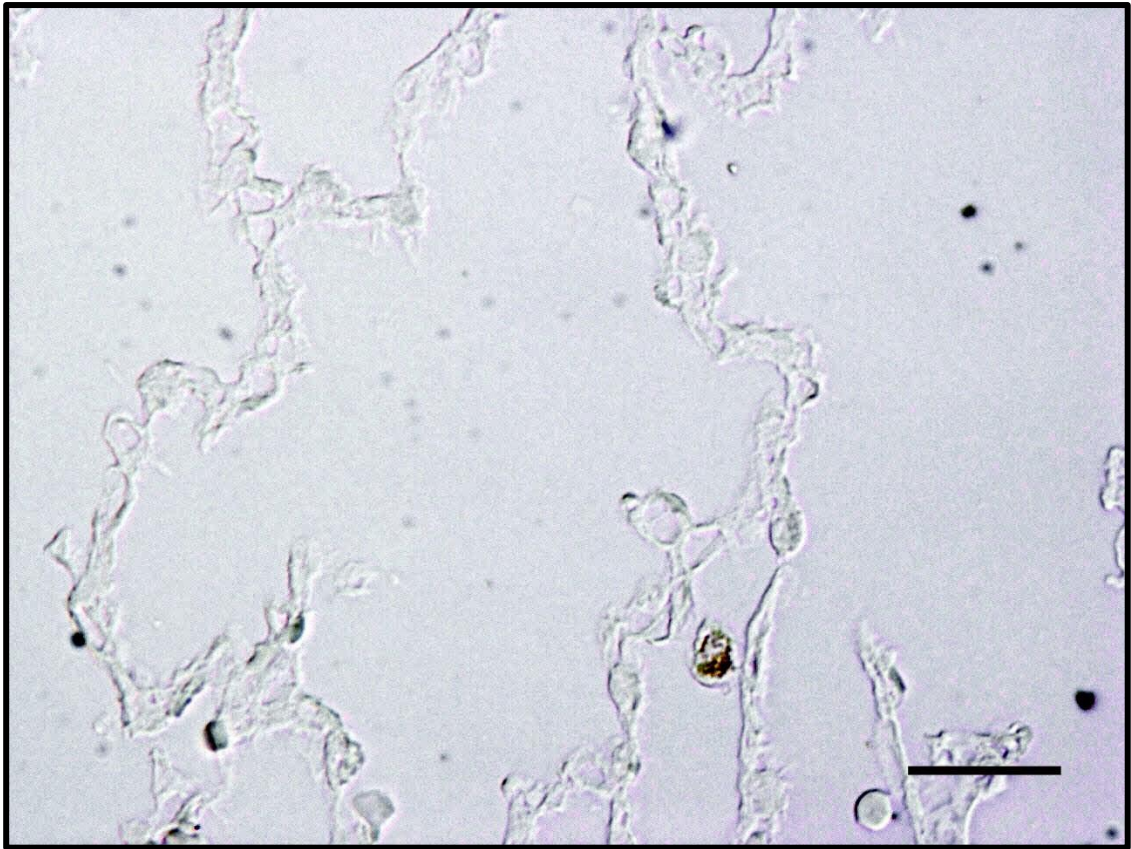


Figura 13: En esta imagen podemos observar un campo de 40x en el que se aprecian paredes alveolares y una célula, que por su morfología podría ser un macrófago, dentro de la luz alveolar, con tinción citoplasmática granular débil para CD68. (Barra de escala 30 micras).

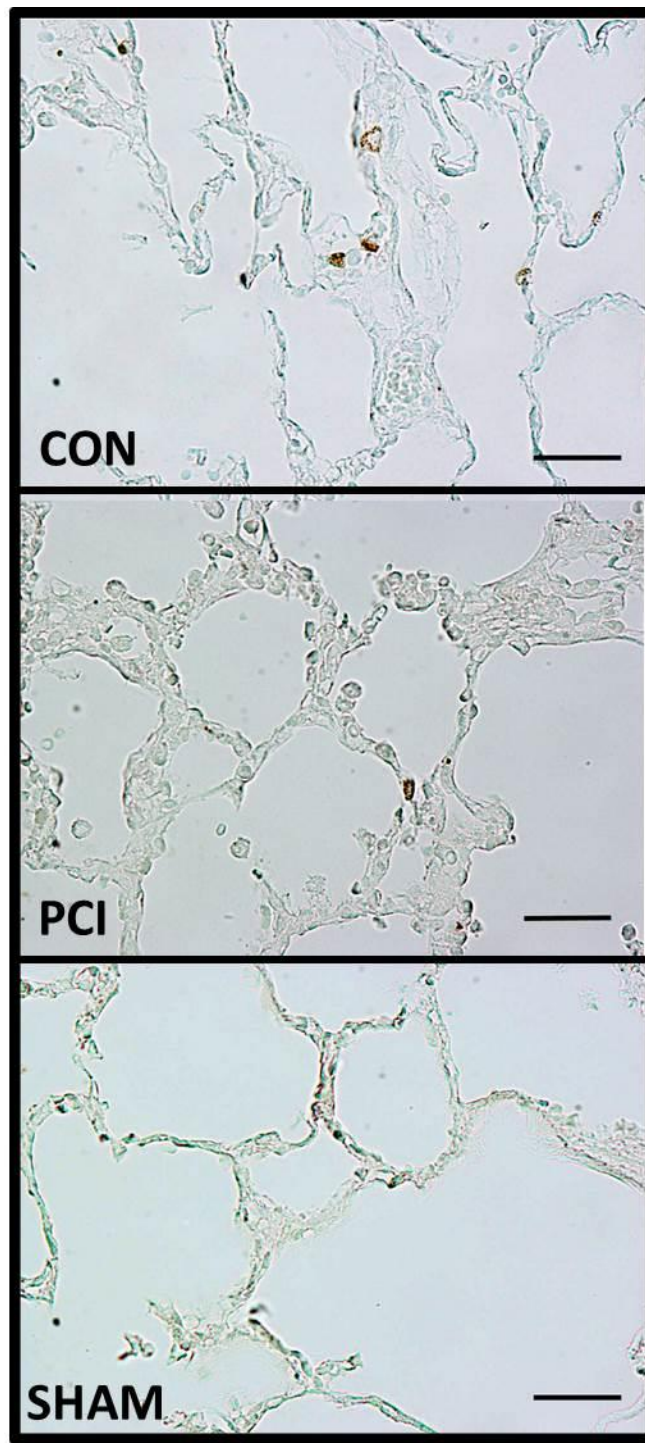


Figura 14: En esta sucesión de imágenes tomadas a 40X aumentos, podemos observar una muestra representativa de las diferencias de expresión de CD68 entre grupo Control, Sham y PCI. (Barras de escala: 30 micras).

1.2. Estudio analítico:

La IR pulmonar indujo en los pulmones un aumento de la expresión de células con tinción CD68+ en las muestras de pulmón extraídas a los 30 minutos tras la reperfusión en los animales [15,6 (4,01) vs 0 (0), CON vs SHAM, $p=0,011$]. En los pulmones del grupo PCI, se observa una elevación de células CD68+ con respecto al grupo SHAM, que no se sometió a IR pulmonar [1,41 (0,37) Vs 0; PCI vs SHAM, $p=0,022$]. Sin embargo, esta elevación fue significativamente menor en los pulmones sometidos a PCI que en aquellos a los que no se realizó este tratamiento (grupo CON) [15,6 (4,01) vs 1,4 (0,37), Control vs PCI, $p=0,06$]. (Tabla 10, Figura 15)

Tabla 10: Análisis cuantitativo de células con tinción CD68+ en un área de 0,35mm en tejido pulmonar a los 30 minutos de la reperfusión

GRUPO	CD68
CON	15,6 (4,01)*✓
PCI	1,41 (0,37)+
SHAM	0 (0,00)

Los resultados se expresan como media (error típico). 30'Rp: a los 30 minutos post reperfusión. CON: grupo control. PCI: grupo preconditionamiento isquémico. SHAM: grupo de cirugía simulada. (* CON vs SHAM, $p = 0,01$, ✓ CON vs PCI. $p = 0,06$, + PCI vs SHAM, $p=0,022$).

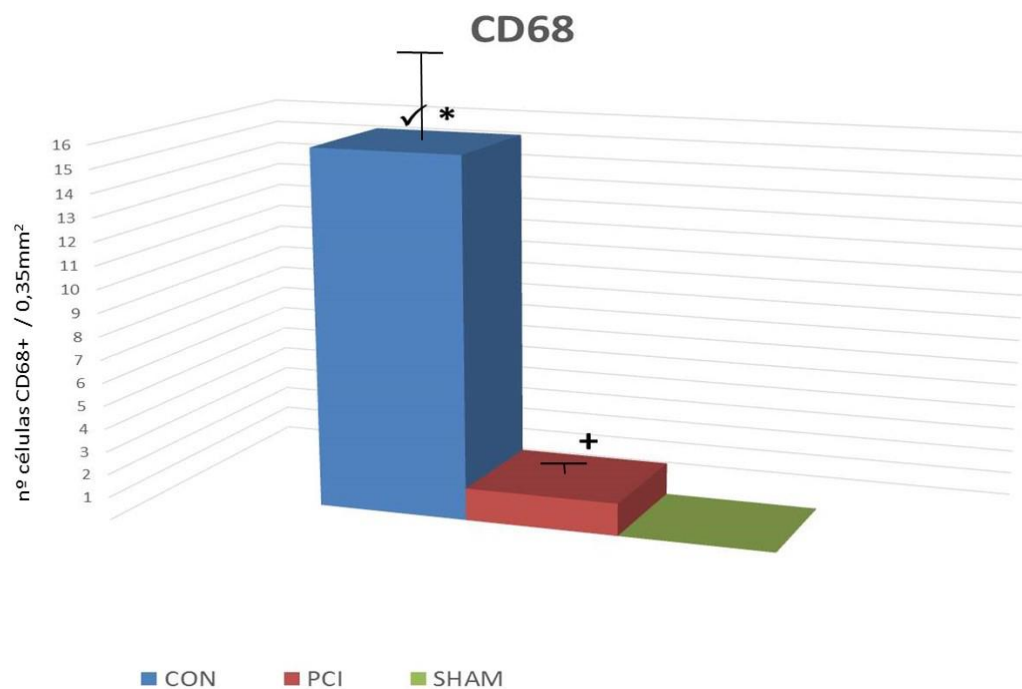


Figura 15: Diagrama de barras que representa el análisis intergrupos de número de células CD68+ en 0,35mm² (40x) de tejido pulmonar. CON: grupo control, PCI: grupo preconditionamiento isquémico y SHAM: grupo de cirugía simulada. (* CON vs SHAM, $p = 0,01$. ✓ CON vs PCI, $p = 0,06$. + PCI vs SHAM, $p = 0,022$).

2. TINCIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA PARA MCP-1

2.1. Estudio descriptivo:

Con este anticuerpo se observa tinción de dos tipos de células: neumocitos y macrófagos alveolares. Las células neumocitarias adquieren tinción nuclear fuerte (Figura 16, 17), mientras los macrófagos presentan tinción citoplasmática (figura 18). No hay tinción aparente, en las muestras analizadas, de los monocitos dentro de los vasos.

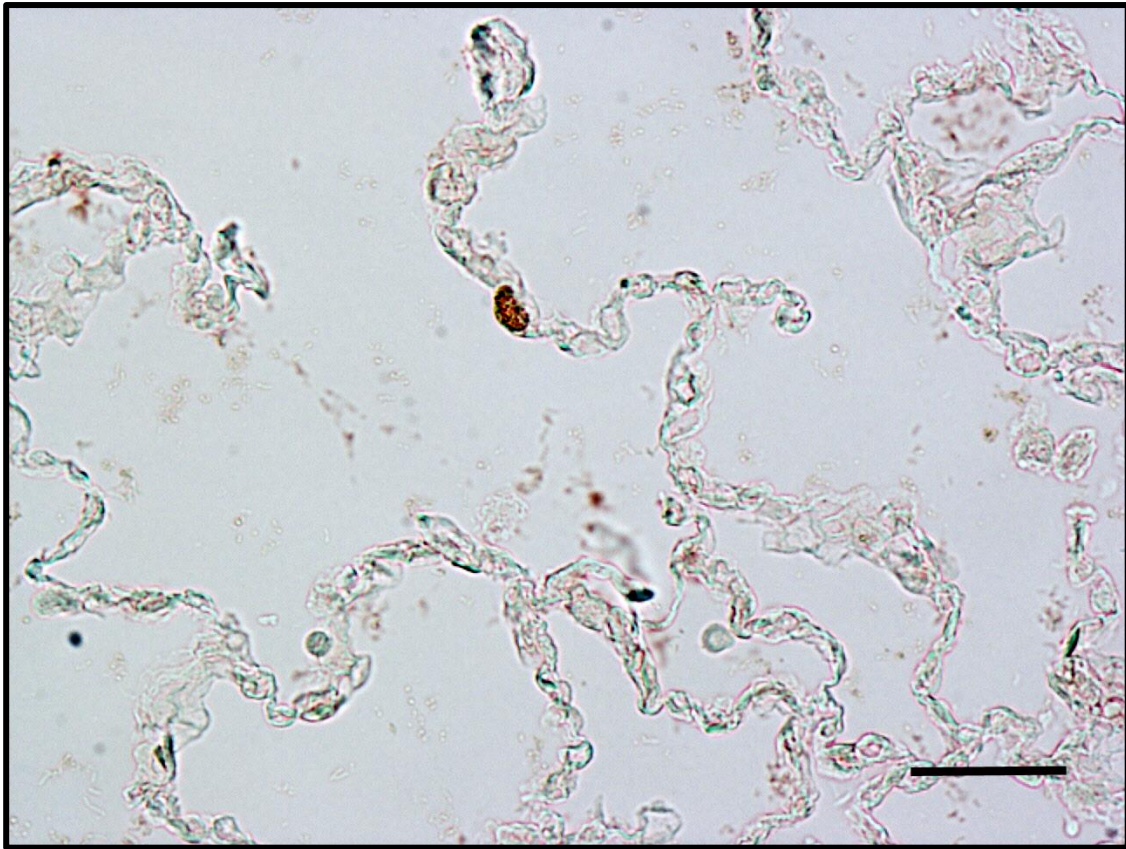


Figura 16: Grupo control. Campo de parénquima pulmonar periférico con presencia tabiques alveolares en los que se identifican núcleos de neumocitos, observándose un núcleo neumocitario teñido de manera granular fuerte para MCP-1. (Barra de escala 30 micras)

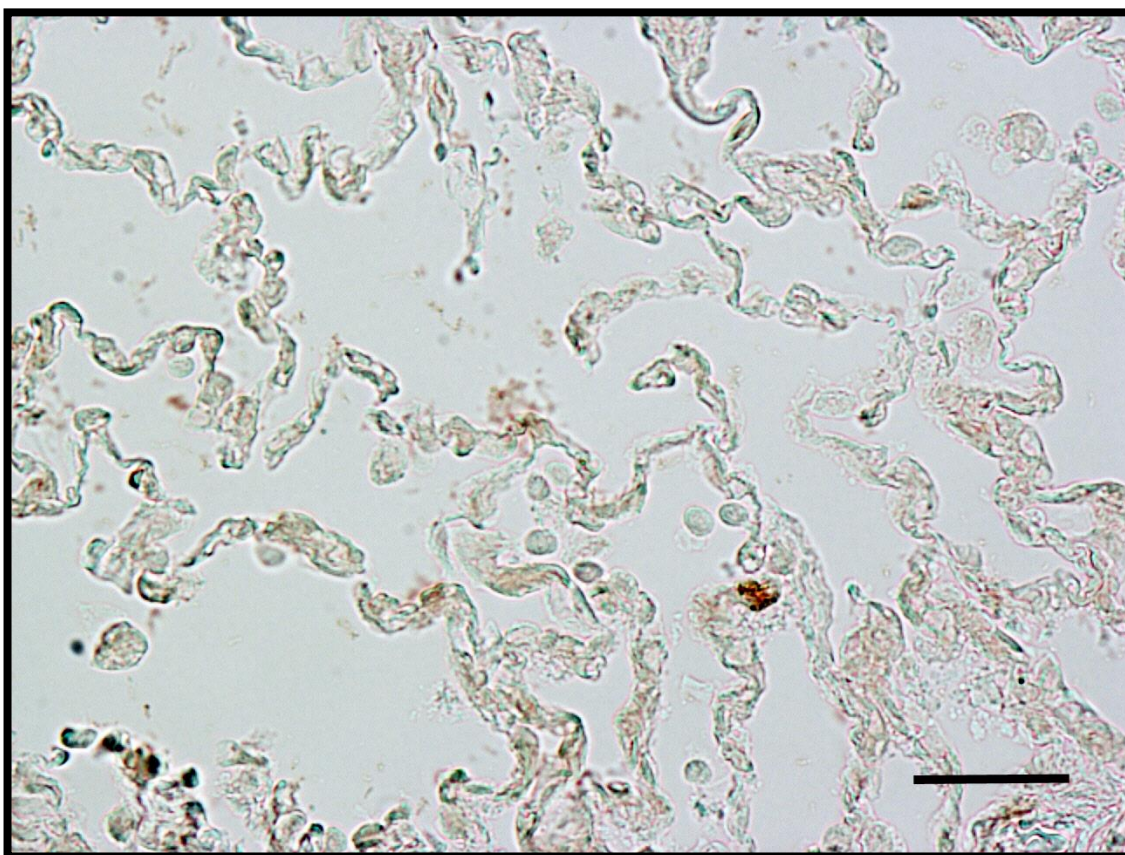


Figura 17: Imagen perteneciente a grupo control. Se observa un campo de parénquima pulmonar periférico a 40x, con presencia paredes alveolares. Se identifica un núcleo neumocitario teñido de manera granular fuerte para MCP-1. (Barra de escala a 30 micras).

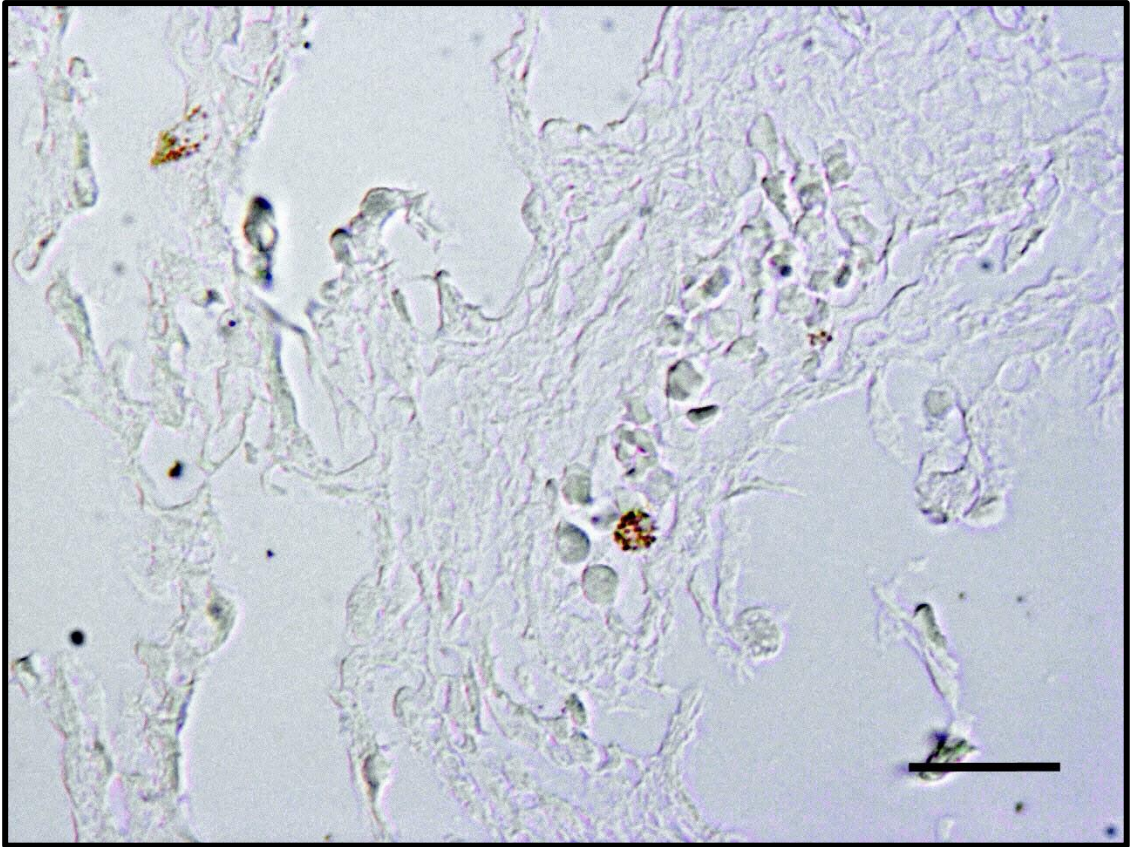


Figura 18: En este campo a 40X se observa parénquima pulmonar periférico en el que se identifican dos macrófagos teñidos de forma granular citoplasmática, en localización intraalveolar e intravascular. (Barra de escala: 30 micras).

2.2. Estudio analítico:

La IR produjo en el tejido pulmonar un aumento de expresión celular de MCP-1 en comparación con el grupo SHAM [13,7 (3,98) vs 1,12(1,51). Control vs SHAM. $p=0,027$]. Al someter al pulmón al tratamiento con PCI previo a la IR, se observa una disminución de expresión MCP-1 en las células pulmonares en comparación con el grupo no tratado (CON) [13,7(3,98) vs 1,25(0,54). CON vs PCI. $p=0,017$]. Sin embargo, no se observan diferencias significativas de expresión de MCP-1 en las células de pulmones sometidos a PCI y los del grupo de cirugía simulada (SHAM). (Tabla 11, Figura 19)

Tabla 11: Análisis cuantitativo de las células con tinción para MCP-1 en tejido pulmonar a los 30 minutos de la reperfusión.

GRUPO	MCP1
CON	13,7 (3,98)*✓
PCI	1,25 (0,54)
SHAM	1,12 (0,51)

Los resultados se expresan como media (error típico). 30'Rp: a los 30 minutos post reperfusión. Control: grupo control. PCI: grupo preconditionamiento isquémico. SHAM: grupo simulado.(* CON vs PCI, $p=0,017$, ✓ CON vs SHAM, $p=0,027$).

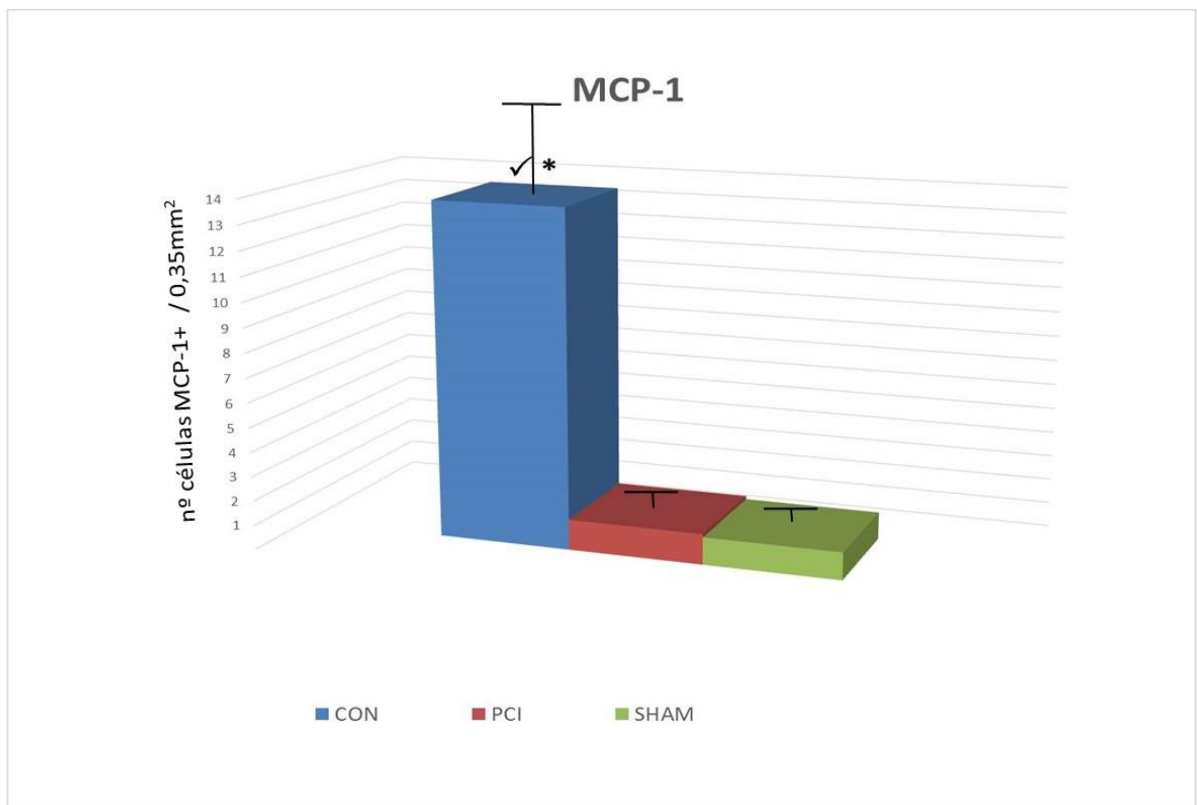


Figura 19: Diagrama de barras que representa el análisis intergrupos de número de células MCP-1+ en 0,35mm² (40x) de tejido pulmonar. Control: grupo control, PCI: grupo preconditionamiento isquémico y SHAM: grupo de cirugía simulada.

3. DETERMINACIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA DE CASPASA-9

3.1. Estudio descriptivo:

En las muestras tisulares obtenidas de los especímenes a los 30 minutos de la reperusión, podemos identificar tinción para caspasa-9 principalmente en células neumocitarias, pero también existe en células de estirpe macrofágica. La tinción se puede observar de predominio citoplasmático en neumocitos y

macrófagos (Figura 20), pero en algunos de los campos, por el contrario, la tinción se presenta a nivel nuclear en células neumocitarias (Figuras 21).



Figura 20: En esta imagen, perteneciente a un Control, se observa un campo de 40x, en el que se aprecia claramente una tinción citoplasmática de los neumocitos de las paredes alveolares y una tinción finamente granular citoplasmática de algunos de los macrófagos en la luz alveolar. (Barra de escala: 30 micras)

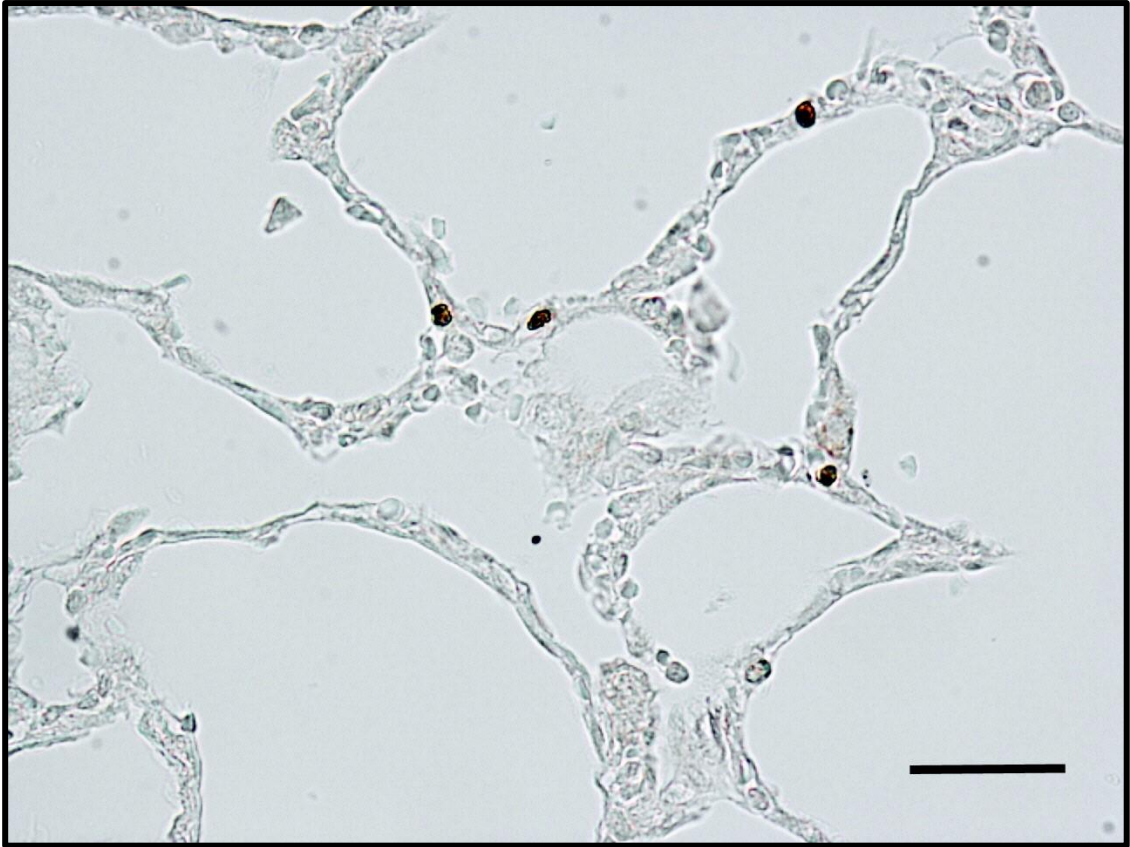


Figura 21: En esta foto, correspondiente al grupo control, se puede observar un campo de parénquima pulmonar periférico a 40 aumentos, donde podemos identificar tinción fuerte de localización exclusivamente nuclear en las células neumocitarias alveolares. (Barra de escala: 30 micras).

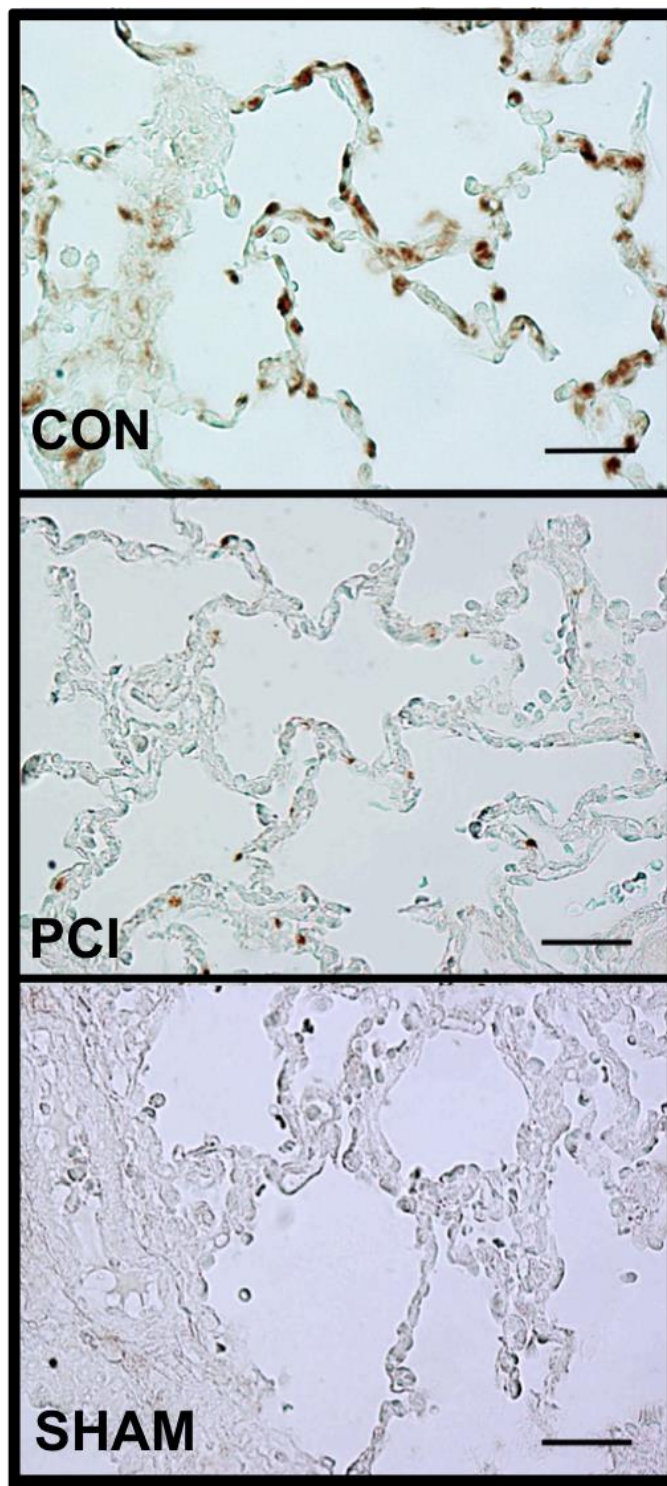


Figura 22: En esta serie de imágenes, realizadas a 40X, podemos observar una muestra representativa de las diferencias de tinción IHQ de caspasa-9 entre el grupo Control, PCI y Sham. (Barras de escala: 30 micras).

3.2. Estudio analítico:

La IR indujo en los pulmones un aumento de la expresión de células teñidas con Caspasa 9 con respecto a la cirugía simulada (Sham) ($P=0,09$ CON vs SHAM). El tratamiento previo del pulmón con PCI disminuye la expresión de caspasa 9 de las células neumocitarias en comparación al grupo control (sometido a IR) ($p=0,06$ PCI vs CON). Sin embargo, aunque existe una mayor expresión de tinción de caspasa 9 en tejido pulmonar del grupo PCI frente al sham, no es una diferencia estadísticamente significativa (tabla 12).

Tabla 12: Tabla de frecuencias de casos y su porcentaje por grupo según el grado de observado de expresión de Caspasa-9 a los 30 minutos de la reperusión.

GRUPO	GRADO	Frecuencia	Porcentaje
SHAM	Nada	4	100%
	< 50%	0	0,0%
	>50%	0	0,0%
CON	Nada	0	0,0%
	< 50%	2	40,0%
	>50%	3	60,0%
PCI	Nada	5	83,3%
	< 50%	1	16,7%
	50%	0	0,0%

CON: grupo control. PCI: grupo preconditionamiento isquémico. SHAM: grupo de cirugía simulada.

4. DETERMINACIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA DE BCL-2

4.1. Estudio descriptivo:

En las muestras obtenidas de tejido pulmonar a los 30 minutos de la reperusión, podemos observar dos tipos celulares que muestran positividad para Bcl-2: células neumocitarias (Figura 23) y células de extirpe macrofágica (Figura 24 y 25). En ambos tipos celulares, la tinción es de predominio citoplasmático y de aspecto granular y se localizan predominantemente en las paredes alveolares.

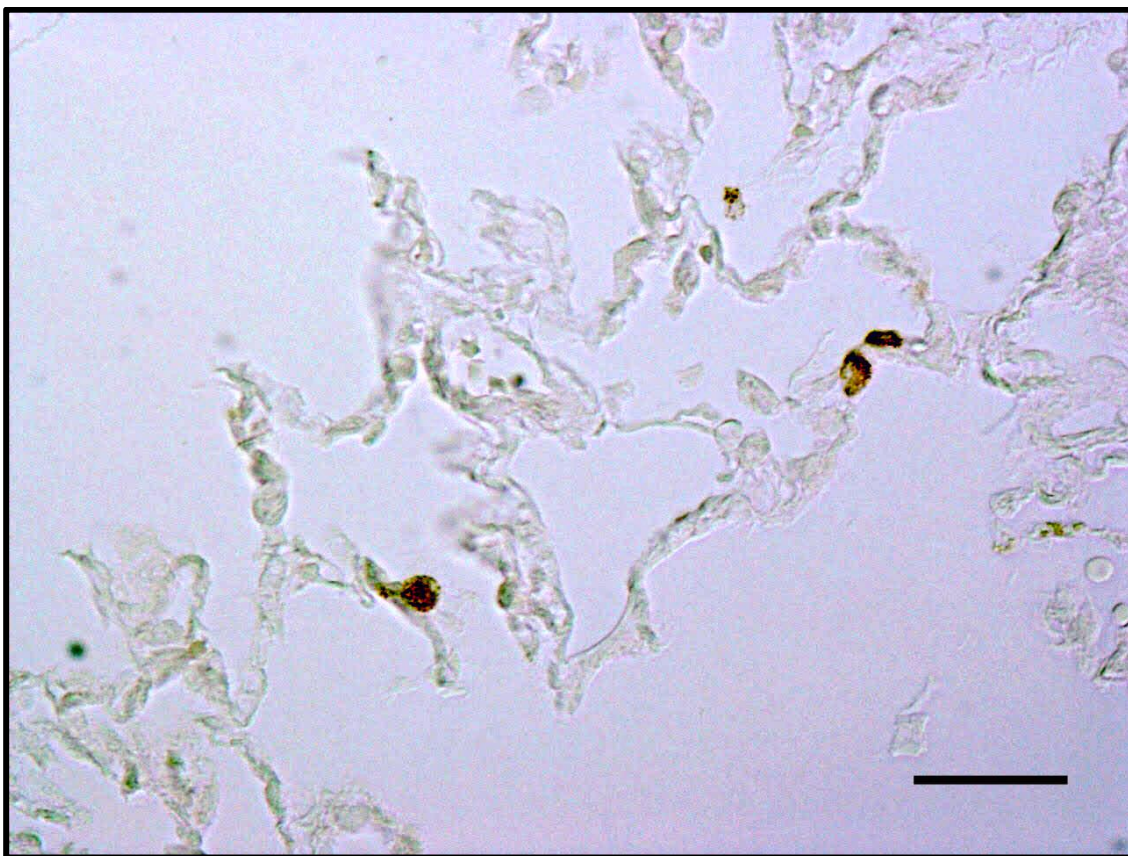


Figura 23: Muestra grupo PCI. Apreciamos en esta imagen a 40X, zonas de parénquima pulmonar formado por paredes alveolares, en las que se identifican células neumocitarias con clara tinción positiva granular para Bcl-2, de localización citoplasmática.

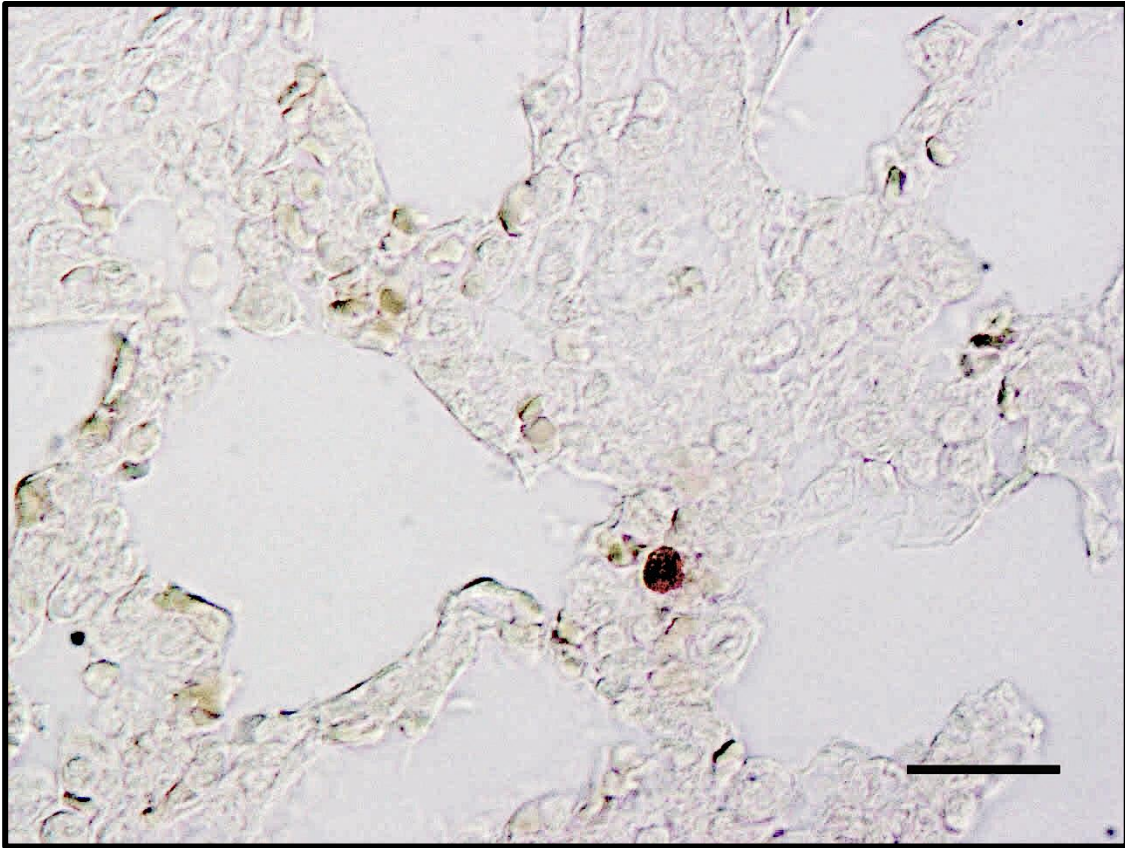


Figura 24: En esta imagen correspondiente al grupo PCI, podemos observar un campo de 40x, correspondiente a parénquima pulmonar periférico en el que se observan algunas luces alveolares colapsadas pero se distinguen de manera individualizada los tabiques alveolares. En este campo se observa una célula teñida que podría corresponder a estirpe macrofágica, con tinción positiva fuerte para Bcl-2, de aspecto granular y localización fundamentalmente citoplasmática. (Barra de escala: 30 micras).

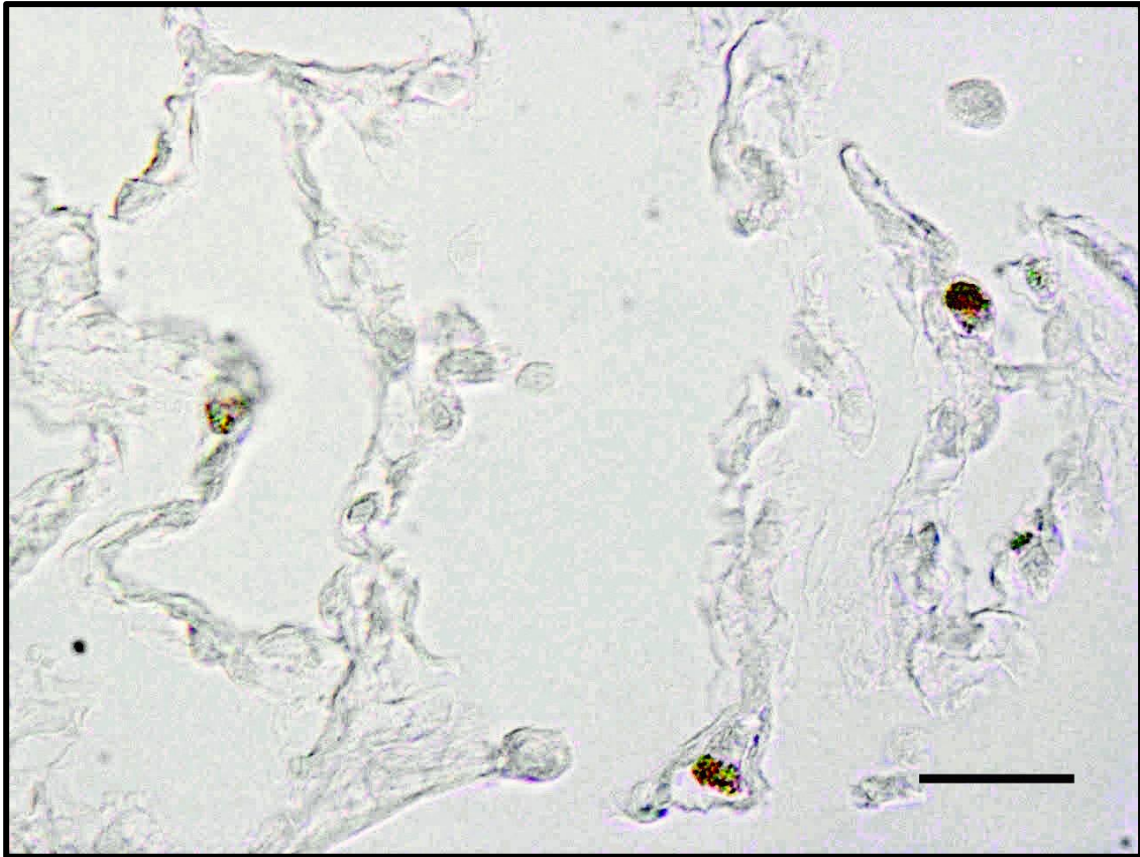


Figura 25: Grupo PCI. Observamos en un campo de 63x, parénquima pulmonar formado por paredes alveolares, en el que destacan dos células con tinción citoplasmática para Bcl-2, que por su forma y localización parecen ser macrófagos alveolares. (Barra de escala: 10 micras).

4.2. Estudio analítico:

El PCI indujo un aumento de expresión de la proteína Bcl-2 en las células pulmonares, con respecto al grupo sometido a IR (grupo control) [0,4(0,4) vs 6,4(3), Control vs PCI, $p=0,044$]. De la misma manera, el número de células pulmonares que expresan Bcl-2 se encuentra aumentado en los pulmones sometidos a PCI con respecto al grupo de cirugía simulada o SHAM [6,4 (3) vs 0,25 (0,25). PCI vs SHAM. $p=0,047$]. Por el contrario, el grupo sometido a IR (control) no presenta un aumento de expresión estadísticamente significativa de las células teñidas con Bcl-2 con respecto al grupo SHAM. (Tabla 13, Figura 26)

Tabla 13: Análisis cuantitativo de células teñidas con Bcl-2 a los 30 minutos de la reperfusión.

GRUPO	BCL2
CON	0,4 (0,4)*
PCI	6,4 (3)+
SHAM	0,25 (0,25)

Los resultados se expresan como media (error típico). 30'Rp: a los 30 minutos post reperfusión. CON: grupo control. PCI: grupo preconditionamiento isquémico. SHAM: grupo simulado. (* CON vs PCI, $p=0,04$, + PCI vs SHAM, $p=0,047$)

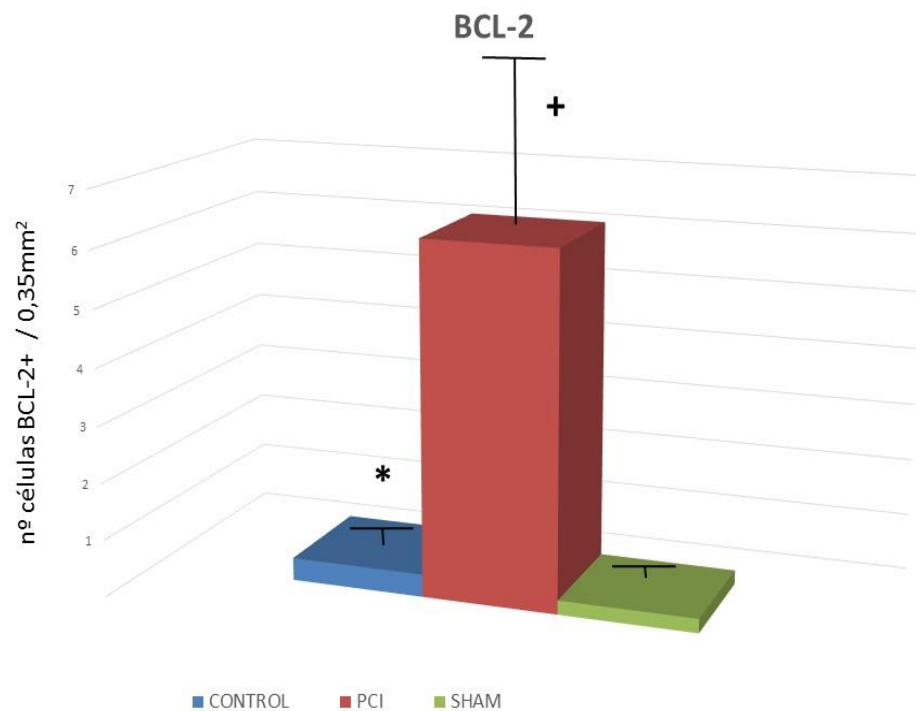


Figura 26: Diagrama de barras que representa el análisis intergrupos de número de células BCL-2+ en 0,35mm² (40x) de tejido pulmonar. CON: grupo control, PCI: grupo preconditionamiento isquémico y SHAM: grupo de cirugía simulada. (* CON vs PCI, p=0,04, + PCI vs SHAM, p=0,047)

DISCUSIÓN

En diversas situaciones clínicas y quirúrgicas, el pulmón se ve sometido inevitablemente a períodos de isquemia más o menos prolongados con el consiguiente riesgo de producirse un SIR pulmonar. Algunas de estas técnicas son muy complejas, pero cada vez se realizan con más frecuencia en la práctica clínica, como son: la angioplastia o trombolisis en vasos pulmonares, extirpación de tumores con localizaciones complejas que precisan de resecciones pulmonares con reimplantación de lóbulos pulmonares viables, by-pass cardiopulmonar durante la circulación extracorpórea y el trasplante pulmonar. El SIR pulmonar, implica una compleja reacción inflamatoria en la que participan células inmunes y diversos mediadores, y que cursa con una disrupción de las barreras endoteliales y epiteliales, dando lugar a edema pulmonar grave y disfunción pulmonar (13), lo cual, aumenta considerablemente la morbilidad temprana postquirúrgica.

La investigación experimental sigue siendo fundamental a la hora de buscar y validar estrategias terapéuticas que ayuden a minimizar el daño pulmonar secundario a IR y por tanto reducir la disfunción del órgano y graves complicaciones postoperatorias en los seres humanos cuando se realice la traslación a situaciones clínicas.

El presente trabajo investiga, en un modelo experimental en cerdo, consistente en un autotrasplante pulmonar, los efectos de la isquemia-reperfusión sobre el pulmón y el posible beneficio del preconditionamiento isquémico (PCI) como estrategia terapéutica para minimizar estos efectos.

Los modelos experimentales habituales que estudian la IR pulmonar, suelen asociarse a enfriamiento progresivo del órgano y perfusión con soluciones de preservación, condiciones que se dan casi exclusivamente en el trasplante clásico, situación en la que tiempos de isquemia prolongados, de hasta 10 horas, no se asocian a lesiones por IR más graves en estudios experimentales (83). Muy pocos estudios se realizan, como nuestro modelo, en circunstancias de isquemia caliente o normotérmica, que es el contexto en el que se desarrollan muchas situaciones medico-quirúrgicas en la clínica, que implican IR pulmonar. Existe diferente tolerancia a la isquemia según el animal utilizado, siendo el tiempo de isquemia normotérmica tolerado en conejos de 60 minutos (76), mientras que en mamíferos más grandes, como los perros, asciende 120 min (75). En nuestro modelo, utilizamos un tiempo de isquemia media de 107 minutos en condiciones normotérmicas, que no es letal pero producirá un daño pulmonar por IR.

Los modelos experimentales de IR pulmonar se realizan mayoritariamente en pequeños roedores, pero los modelos desarrollados en grandes mamíferos, como el presentado en este estudio, son en muchas ocasiones, el último escalón en este proceso de investigación traslacional. Se han estudiado las consecuencias del daño por IR pulmonar en distintos modelos experimentales en perros (84), ovejas (85) y cerdos (60,77,86) fundamentalmente.

Como se ha dicho, en nuestro un modelo de autotrasplante pulmonar investigamos los posibles efectos beneficiosos del PCI sobre daño pulmonar por IR. El PCI, es una técnica que somete a breves periodos de isquemia a tejidos y

órganos que van a sufrir un periodo de isquemia prolongado y potencialmente letal, es uno de los mecanismos descritos más potentes para minimizar los efectos nocivos de la IR. Este efecto protector se describió inicialmente en miocardio (87), y posteriormente ha demostrado su efecto protector en otros órganos como hígado, cerebro, médula espinal, intestino y riñón (55).

Existen dos tipos de preconditionamiento isquémico: directo y remoto. El PCI directo, tiene como limitación el estrés sobre el propio órgano diana y daño mecánico sobre sus estructuras vasculares, que no siempre son accesibles para poder realizar el PCI, sobre todo cuando se quiere proteger a uno o diferentes órganos de la respuesta sistémica por SIR de órganos remotos. El PCI remoto, consiste en breves períodos de isquemia en un órgano, que confieren protección frente a una isquemia mantenida en un órgano diferente, en el que se implican mediadores neurogénicos y humorales, aunque sus mecanismos no son bien conocidos (56). Se ha demostrado el efecto protector del PCI remoto sobre daño por IR de órganos como riñón, miocardio, intestino, músculo, hígado y pulmón (88), siendo ejercido más frecuentemente mediante isquemia de una extremidad mediante un manguito. En un estudio reciente en un modelo de trasplante hepático en ratones, comparan los efectos protectores del PCI directo y PCI remoto sobre el daño por IR del injerto, demostrándose menor efecto protector del PCI remoto en la fase más precoz. Este experimento muestra un efecto sinérgico cuando se aplican ambos PCI (89).

Nuestro modelo experimental estudia si el PCI directo sobre pulmón es capaz de ejercer un efecto protector, modulando el SIR pulmonar. En la actualidad, son pocos los estudios relativos al PCI pulmonar directo (realizado sobre estructuras pulmonares) publicados en la literatura, de los cuales, se realizan en grandes mamíferos en escasas ocasiones, habiéndose demostrado su efectividad en modelos caninos (66,67) y porcinos (59,60), además de un estudio realizado por Yang y cols en pacientes sometidos a resecciones pulmonares mayores. En el estudio de Yang se realiza PCI mediante dos ciclos de oclusión de 5 minutos de la arteria pulmonar, seguidos de 5 minutos de reperfusión, demostrando una disminución de la apoptosis a los 30 y 60 minutos de la reperfusión en el grupo preconditionado frente al control (73).

Nuestro modelo experimental, estudia si el PCI pulmonar directo es capaz de modular los principales mecanismos fisiopatológicos del daño por IR como son la inflamación y la apoptosis. La principal originalidad de nuestro proyecto, es que el estudio de los cambios inducidos por IR y los posibles efectos del PCI, se realiza a nivel histopatológico e inmunohistoquímico. Otro aspecto interesante del modelo es que centra su atención en la respuesta inflamatoria y apoptótica precoz (en los primeros treinta minutos de reperfusión pulmonar).

En un modelo de SIR pulmonar similar al nuestro, se ha observado elevación de citoquinas proinflamatorias (TNF α , IL1 y MCP-1), así como su RNAm, en estudios bioquímicos del pulmón tras diez y treinta minutos de reperfusión, y demuestran su disminución al someter a los animales a PCI (60).

Sin embargo, este tipo de análisis bioquímico, no permite identificar los tipos celulares implicados y su localización en las estructuras del tejido pulmonar. Lee y cols, en diferentes experimentos en ratas y conejos, analizan, con microscopía óptica y electrónica, los cambios histopatológicos del efecto del PCI en modelos de IR pulmonar, analizándose la mayoría 1 hora tras la reperfusión (65,66,79). Estos estudios no profundizan, como en el que presentamos aquí, en la expresión inmunohistoquímica de mediadores inflamatorios y apoptóticos, y no realizan los estudios histológicos de manera tan temprana.

ESTUDIOS HEMODINÁMICOS Y GASOMÉTRICOS:

El SIR produce cambios biológicos, fisiológicos e histológicos que dan lugar a un aumento de la permeabilidad microvascular pulmonar, elevación de las resistencias vasculares pulmonares, elevación de las presiones en las vías respiratorias y anormalidades en el intercambio de gases (11,21).

Debido a lo anterior, hemos realizado determinaciones gasométricas y hemodinámicas en los tres grupos antes de la reperfusión y a los 30 minutos, para valorar los efectos que el SIR pudieran tener sobre estas, y la posible modulación del PCI.

Los diferentes grupos experimentales de este estudio presentan una gran homogenidad en cuanto a las variables hemodinámicas y gasométricas a lo largo

del todo el experimento, no encontrándose alteraciones en el intercambio de gases ni en los parámetros hemodinámicos, que se encuentran dentro de la normalidad, ni existen diferencias significativas entre los grupos.

En la mayoría de estudios de IR pulmonar, la isquemia se mantiene de manera más prolongada que en nuestro trabajo, y las alteraciones antes descritas se ponen de manifiesto tras varias horas de reperusión (68,90). En algunos estudios similares, tampoco han encontrado alteraciones significativas en cuanto a los valores gasométricos, como Sperb Pilla y col (tras 30 min de isquemia y 90 minutos de reperusión) (69).

El PCI ha demostrado en diferentes trabajos, mejorar la oxigenación (64,66-68), probablemente debido a una mejora del intercambio gaseoso y mejoría de la microcirculación, y una disminución de la PAPM (65,66). La mayoría de estos estudios se realizan con modelos sometidos a mayor tiempo de isquemia y/o mayor tiempo de reperusión (1-2h). En un experimento realizado en un modelo similar al nuestro se realizan las mismas mediciones hemodinámicas y gasométricas, sin observar diferencias significativas en las variables, a excepción de una significativa mejoría de la paO_2 a los 30 min de la reperusión tras aplicar PCI (60), en dicho estudio la muestra de cada grupo es más grande, lo que podría permitir alcanzar la significación que no se alcanza en el presente estudio.

Nuestro modelo de estudio, se ha desarrollado para el estudio del efecto protector del PCI sobre la respuesta inflamatoria y apoptótica sobre los tejidos, en una fase

muy precoz (30 min) de la reperfusión, por lo que es posible que los efectos sobre las variables gasométricas y hemodinámicas todavía no se hubieran manifestado. Además, en nuestro caso, refuerza la idea de que las diferencias que se observan en los estudios histopatológicos e inmunohistoquímicos pueden ser atribuibles a la IR y a la posible modulación del PCI, y no al daño pulmonar producido por otras causas.

EXAMEN HISTOLÓGICO DEL TEJIDO PULMONAR MEDIANTE MICROSCOPIA OPTICA (TINCIÓN HEMATOXILINA-EOSINA):

Los cambios histológicos más frecuentemente descritos mediante microscopía óptica en biopsias pulmonares tras IR pulmonar de distinta etiología, incluyen: destrucción de la arquitectura alveolar, edema intersticial, congestión vascular, hemorragia intra-alveolar, infiltrado leucocitario en vasos e intersticio pulmonar y desunión entre células endoteliales y entre neumocitos (21,24,80-82).

En nuestro trabajo, estudiamos varios parámetros de daño pulmonar agudo como son la congestión, el edema y el infiltrado inflamatorio mediante microscopía electrónica en muestras teñidas con HE. Lo interesante del estudio que presentamos, es que realizamos un análisis del tejido pulmonar de manera muy precoz (a los 30 minutos de la reperfusión).

En nuestro estudio, analizamos el grado de **inflamación**, como ya han hecho otros autores, pero analizamos también el predominio de las distintas células

inflamatorias (macrófagos, neutrófilos y PMN), ya que los estudios anteriormente descritos (Hsu y Peng), solamente contaban los PMN. Nuestros resultados muestran la existencia de infiltrado inflamatorio de predominio macrofágico en el grupo sometido a IR, sin embargo, es mínimo cuando se aplica el PCI previamente, asemejándose a las muestras de tejido del grupo de cirugía simulada.

Con los resultados obtenidos en el experimento, se confirma el protagonismo de los macrófagos alveolares (MA) en la fisiopatología del SIR pulmonar, y que inician su reclutamiento de manera muy temprana, pudiendo detectarse un infiltrado de macrófagos, 30 minutos después de la reperfusión.

Existe abundante evidencia que apoya el importante papel de los MA en la iniciación y propagación del SIR pulmonar. Se han postulado como “células centinelas o sensoras” que detectan precozmente la IR y se comunican con células endoteliales e inmunológicas, iniciando el proceso inflamatorio (91). Los MA son activados durante la isquemia y al inicio de la reperfusión, e inician el reclutamiento de monocitos y macrófagos intersticiales de manera muy temprana mediante liberación de citoquinas proinflamatorias y agentes quimiotácticos ($\text{TNF}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$, MCP-1) (20,45). Otros estudios han demostrado previamente, que la depleción de MA atenúa dramáticamente la producción de citoquinas, protegiendo al pulmón del SIR pulmonar (91-93).

En nuestro estudio se demuestra que el PCI ejerce un efecto protector sobre el SIR pulmonar, disminuyendo la inflamación dependiente de la infiltración por macrófagos, no habiéndose demostrado previamente que el PCI ejercía este

efecto en tejido pulmonar de manera tan temprana.

Existen muy pocos estudios en los que analicen la protección histológica del PCI sobre el SIR pulmonar. Li G. y col, realizan 2 estudios en modelos de IR en perros y conejos, demostrando disminución de PMN, menor edema y menor alteración de la arquitectura pulmonar tras 1h de reperfusión (65,66), pero, a diferencia de nuestro estudio, no analizan otras células inflamatorias, como los macrófagos. El análisis realizado en tiempos tan precoces como en nuestro estudio, solamente lo han realizado Soncul, en un modelo de IR en pulmón aislado de cerdo, pero de manera meramente descriptiva y con microscopio electrónico, identificando menor engrosamiento de septos y extravasación leucocitaria tras el PCI (59).

En nuestro trabajo, no hemos encontrado diferencias en cuanto a la congestión y el edema al analizar las muestras tisulares a los treinta minutos de la reperfusión, lo que probablemente pueda ser debido a lo precoz de nuestros análisis. En estudios experimentales en ratas, a partir de las 48 h de la realización de trasplante pulmonar, puede observarse un grado variable de edema y congestión, infiltrado leucocitario de predominio mononuclear, hemorragia y necrosis (83). En estudios realizados en fases más precoces tras la reperfusión, como el de H-H. Hsu y col., y Peng y col., se han detectado infiltrado de PMN en el intersticio y en alveolos, edema intersticial, extravasación de eritrocitos y engrosamiento de septos alveolares tras 60 min de reperfusión (5,91). La ausencia de congestión y edema en el tejido, que se observa en nuestro modelo, se debe probablemente, a que 30 minutos es un tiempo de reperfusión demasiado escaso como para que se hayan instaurado daños importantes en el tejido pulmonar, ya que en la mayoría

de los trabajos, estos cambios se detectan varias horas tras la reperfusión, y parecen ser menos dependientes del tiempo de isquemia (83).

Por lo tanto, a tenor de nuestros resultados, podemos pensar que el PCI ejerce una acción protectora que puede observarse ya en el tejido pulmonar a los 30 minutos de la reperfusión, en base, principalmente, a una disminución de la infiltración tisular por células de estirpe macrofágica.

DETECCIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA DE CD68:

CD68 es una glicoproteína de 110 kDa de peso molecular, localizada en el citoplasma celular y concretamente en los lisosomas. Se observa positividad en células de distinta diferenciación, incluyendo células de estirpe mieloide, monocítica e histiocítica (94). El CD68 es un marcador histológico usado rutinariamente para identificar monocitos y macrófagos, y ha sido validado ampliamente como marcador de macrófago alveolar. Se ha demostrado un aumento de células CD68+ en el daño pulmonar en de diversas etiologías (95) (96) (18), incluido el daño pulmonar por IR en ratas (97). Prakash y cols demuestran en un modelo de IR pulmonar en ratones, que la depleción de macrófagos alveolares (CD68+) produce una disminución de citoquinas y quimioquinas proinflamatorias (IL-1 β , IL-6, CXCL-1, CXCL-2) y un reclutamiento de neutrófilos al pulmón prácticamente nulo (91), por lo que concluyen que los

MA inician y median las fases precoces del proceso inflamatorio producido a consecuencia del SIR.

No existe prácticamente evidencia científica que relacione específicamente los efectos protectores del PCI sobre el daño por IR pulmonar con los macrófagos y su localización en el tejido pulmonar. Para ello, hemos decidido realizar una tinción IHQ con el anticuerpo CD68 en las muestras tisulares de pulmón. En nuestro trabajo hemos demostrado que, tras someter al pulmón a un proceso de IR, se produce un aumento de células con tinción CD68+ a los 30 minutos de reperfundir el tejido. Además, en el grupo de animales que somete a tratamiento previo con PCI, se muestra una importante reducción de células de estirpe monocito-macrófago teñidas con CD68+ con respecto al grupo sometido a IR, sin embargo sí se observan mayor número células teñidas que en el grupo sometido a cirugía simulada, en el que no encontramos prácticamente tinción.

En el estudio descriptivo de las muestras tisulares de nuestro experimento, identificamos tinción CD68+ en células de estirpe monocito-macrófago, citoplasmática, de aspecto granular (al tratarse CD 68 de una proteína de la pared de los lisosomas). Las células CD 68+ se encuentran en pared alveolar, en interior de los vasos, en luz alveolar e intersticio.

El grupo de Zaynagetdinov demostró que en el pulmón expresan CD68 varios subtipos celulares, pero con diferente intensidad según el tipo celular. Los macrófagos alveolares expresan CD68 de manera intensa, y los macrófagos

intersticiales y los monocitos también la expresan pero con menor intensidad (98). Pensamos que una posible causa de un aumento de células CD68+ en los tejidos sometidos a IR en nuestro experimento es el reclutamiento de monocitos desde la sangre, y la quimiotaxis de los macrófagos intersticiales a los alveolos, ya que el recuento de células se ha realizado fundamentalmente en campos alveolares. Refuerza esta hipótesis, la existencia de estudios que demuestran que la IR pulmonar induce una activación temprana (durante la fase de isquemia) de los macrófagos residentes del pulmón, que liberan $\text{TNF}\alpha$ e IL-1, las cuales inducen a macrófagos y neumocitos a segregar MCP-1, la cual favorece la quimiotaxis de macrófagos y la adhesión de monocitos sanguíneos al endotelio, que se extravasan al foco de inflamación amplificando el daño (16,99).

Una de las posibles explicaciones del aumento de macrófagos CD68+ en pulmones precondicionados frente al grupo de cirugía simulada, que observamos en nuestro experimento, podría ser el aumento de la subpoblación macrofágica M2 (antiinflamatorio) como posible mecanismo de protección del PCI, que podrían disminuir el daño pulmonar por IR, mecanismo propuesto por otros autores en otros tipos de precondicionamiento (100).

DETECCIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA DE MCP-1:

En nuestro experimento, la IR produce un aumento de células con tinción IHQ positiva para MCP-1 en tejido pulmonar a los 30 minutos de iniciarse la reperfusión.

La proteína quimiotáctica de monocitos 1 (MCP-1) es una quimioquina implicada en el reclutamiento o migración de monocitos a los focos inflamatorios activos. Se expresa en diferentes extirpes celulares como macrófagos, fibroblastos, células endoteliales y epiteliales, entre otras. Se ha demostrado que los MA se activan precozmente tras la IR pulmonar y sintetizan MCP-1 y otras citoquinas como $\text{TNF}\alpha$ e $\text{IFN}\gamma$ de manera temprana, contribuyendo al daño pulmonar por IR (16,86). Zhao y cols demostraron en un modelo de IR en pulmón aislado de ratón, que la expresión MCP-1 se correlacionaba con el daño pulmonar por IR, y que los MA eran las principales fuentes de los mismos, ya que su depleción disminuye la expresión de MCP-1 (92).

En nuestro experimento hemos podido comprobar, que la IR produce un aumento de células teñidas con MCP-1 en tejido pulmonar, y también un aumento de células CD68+, probablemente atraídas por el estímulo quimiotáctico que ejerce esta potente quimioquina sobre los macrófagos. De la misma manera, comprobamos que estos cambios se manifiestan en los tejidos de manera muy temprana tras la reperfusión. Otros autores como Eppinger y cols, han observado en un modelo de IR en ratas la presencia de un aumento de MCP-1, tras la

reperfusión, y que el bloqueo de esta quimioquina con un anticuerpo específico, ejercía una protección precoz (a los 30 minutos de la reperfusión) frente a SIR pulmonar (15). Lo original de nuestro trabajo es que relaciona la presencia de esta quimioquina en el tejido, con la presencia de un marcador para macrófagos como es el CD68+.

En nuestro estudio, hemos demostrado que la IR induce un aumento del número de células teñidas con MCP-1 en tejido pulmonar a los 30 minutos de la reperfusión, y el tratamiento con PCI produce una disminución de células con expresión de MCP-1 que se iguala a los de los tejidos de animales no sometidos a IR pulmonar.

Simón y cols, en un modelo de IR similar al nuestro, demuestran una disminución de MCP-1 y otras citoquinas, en tejido pulmonar tras la aplicación de PCI, pero se realiza en homogeneizados mediante *western blot*, no pudiendo evidenciarse la células implicadas (60). En nuestro trabajo, al realizar una tinción IHQ en tejido pulmonar, nos permite identificar el tipo de célula implicada en la producción de MCP-1. Las células teñidas con MCP-1 en nuestro experimento son de dos estirpes: monocito-macrófagos, que son las predominantes, pero también se aprecia tinción de algunas células neumocitarias. Esto corrobora lo que concluyeron Sharma y col en un experimento basado en un modelo de hipoxia-reoxigenación de tejido pulmonar de rata *in vitro*, en el que demostraron la secreción de MCP-1 y otras citoquinas de manera temprana por los MA activados mediante citometría de flujo, y sugerían también la intervención de los

neumocitos tipo II en su secreción, en respuesta al $\text{TNF}\alpha$ e IL-1 producidos precozmente por los macrófagos (16).

DETECCIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA DE CASPASA 9:

En nuestro experimento, realizamos una tinción IHQ para caspasa-9, que muestra una tinción celular abundante en neumocitos y algunos macrófagos a los 30 minutos de la reperfusión.

Las caspasas son proteínas clave en la transducción y ejecución de la señal apoptótica inducida por una diversidad de estímulos y se encuentran implicadas en gran número de procesos patológicos, como es el daño pulmonar por IR. Se ha visto, además, que la apoptosis es la principal causa de muerte de células neumocitarias tras IR pulmonar (11). La apoptosis del neumocito y linfocitos tiene lugar tras la reperfusión, de manera muy temprana, nada más iniciarse ésta (30), por lo que se ha relacionado con el estrés oxidativo, aunque se ha demostrado inicio de actividad apoptótica ya durante el período de isquemia (101). Las caspasas se han utilizado como marcadores de éste proceso patológico, demostrándose su activación de manera precoz, y su correlación con la apoptosis (102). Debido a lo anterior, las caspasas se han convertido en una de las dianas de terapias para combatir el daño pulmonar por IR.

Las caspasas más utilizadas más frecuentemente como marcadores de apoptosis, son la 8 (caspasa iniciadora de la vía extrínseca), la caspasa 9 (iniciadora de la vía intrínseca o mitocondrial), y la 3 (efectora, común a las dos vías). Su activación, tiene una alta correlación con la inducción de apoptosis, ya que una vez iniciada la cascada, la fragmentación del DNA por la PARP es inevitable, y es una técnica más precoz que las que detectan fragmentación del DNA y el fraccionamiento de la enzima PARP (47). Otra de las ventajas es que se puede detectar por diferentes técnicas: electroforesis, métodos fluorométricos, y también mediante inmunohistoquímica, como hemos realizado en nuestro experimento, que presenta frente a otras técnicas la ventaja de poder identificar en muestras de tejidos, la localización y el tipo de células apoptóticas.

Syed M. Quadri y col. realizaron un estudio en modelo de trasplante pulmonar en ratas y evaluaron la apoptosis mediante determinación de actividad de caspasas (3, 8, 9) mediante fluorimetría, y técnica de TÚNEL. Identificaron actividad de caspasas inmediatamente tras la reperusión, y vieron que la apoptosis afectaba principalmente a dos poblaciones celulares: Linfocitos y células endoteliales. Además administraron inhibidor de caspasas, y pudieron comprobar que tras ello se disminuía la cantidad de células teñidas mediante el método de TUNEL a las 18h hasta hacerse indetectables y mejoraba la función del órgano. Se puede concluir por lo tanto, que aunque la apoptosis compromete la función del pulmón tras la IR (102).

En nuestro experimento, demostramos que la IR indujo en los pulmones un aumento de la expresión de células teñidas con Caspasa-9 en tejido pulmonar a los 30 minutos de la reperfusión. El tratamiento previo del pulmón con PCI disminuye la expresión de caspasa-9 de las células neumocitarias en ese momento, por lo que se demuestra la modulación del daño precoz por apoptosis en el contexto de IR gracias a la aplicación de PCI. Hemos observado, que las células que la expresan, y están sujetas potencialmente a la apoptosis, son principalmente los neumocitos tipo I, y algún macrófago en la luz alveolar.

La caspasa-9 es protagonista de la vía intrínseca o mitocondrial de la apoptosis. En diversos estudios, se ha relacionado la alteración de la función mitocondrial con el daño por IR en el pulmón (44). Al producirse daño en la membrana de la mitocondria, se libera citocromo C, que junto a Apaf-1, produce activación de la caspasa-9, por lo que la determinación de ésta parece ser un buen marcador de daño pulmonar (103). Por todo ello, nuestro experimento apunta a que el PCI podría ejercer una protección mitocondrial frente al daño pulmonar por IR.

Se ha demostrado en riñón, y en pulmón posteriormente, que la vía intrínseca se activa durante la isquemia, pudiéndose identificar actividad de caspasa 9 ya durante este período, pero se precisa de condiciones que se dan durante la reperfusión para que se active la vía extrínseca y se llegue a activar la caspasa efectora-3 y se lleve a cabo el proceso apoptótico (36,104). Al tratarse de un momento tan precoz tras la reperfusión, (30 minutos), en nuestro experimento decidimos realizar la determinación de la caspasa 9 en el tejido, pues su activación conduce inevitablemente a la apoptosis pero se activa más

precozmente que las caspasas de la vía extrínseca y las efectoras.

No hemos encontrado ningún trabajo en la literatura, a parte de nuestro estudio, en el que se analice la modulación del daño por IR pulmonar mediante PCI, utilizando tinción IHQ de caspasa-9 en el tejido para demostrar protección celular, y en concreto mitocondrial.

Al realizar el estudio descriptivo de las preparaciones, pudimos observar que la tinción se produce de manera fundamentalmente citoplásmica en las células neumocitarias y macrófagos de luz alveolar, pero en algunos campos, se observan neumocitos con tinción fundamentalmente nuclear.

Existe un desacuerdo en la literatura respecto a la localización intracelular de la caspasa-9, ya que se ha descrito tanto en mitocondria, núcleo y citoplasma (105). Lo más frecuente es encontrarla en citoplasma, cuando se activa al unirse a Apaf-1 y al citocromo C para formar el apoptosoma . Ritter y cols publican en 2001 un trabajo en el que muestran una localización constitutiva de caspasa-9 en el núcleo de células epiteliales mamarias, demostrando que la activación de la procaspasa-9 nuclear precisa del fraccionamiento a través de la caspasa-3 (106). En base a lo anterior, nuestra hipótesis es, que las células neumocitarias con tinción nuclear para caspasa-9, presentan positividad por activación de la procaspasa-9 nuclear a través de la caspasa-3, probablemente activada a través de la vía extrínseca de la apoptosis.

DETECCIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA DE BCL-2:

Las proteínas Bcl-2, son una familia de proteínas intracelulares, cuya función es la regulación de procesos de permeabilización mitocondrial, constituyendo un punto clave en el desarrollo de la apoptosis. Dentro de la familia Bcl-2 existen miembros proapoptóticos (BAX, BID, BAD, BAK...) y antiapoptóticos (Bcl-2, bcl-X_L, Mcl-1...), y el balance de la expresión de estas proteínas determina la apertura del poro en la membrana mitocondrial, con la liberación de citocromo C y la activación de la caspasa 9 (34). El síndrome IR pulmonar ha demostrado disminuir los niveles de los miembros antiapoptóticos, Bcl-2 y Bcl-X_L y como consecuencia, se produce un aumento de la apoptosis en el pulmón (31). La sobreexpresión génica de Bcl-2 previo a trasplante pulmonar, ha demostrado en un modelo animal, mejorar la función del injerto, disminuir niveles citosólicos de citocromo C, disminuir la actividad de caspasas-3 y -9 (ambas activadas posteriormente al lugar de intervención de Bcl-2 en la vía mitocondrial), y también disminuir la cantidad de IL-1 β del injerto (107).

En nuestro trabajo, hemos observado una disminución de la tinción Bcl-2 en las células de los animales sometidos a SIR pulmonar, a los 30 minutos de la reperusión, lo que sugiere un aumento de la apoptosis a consecuencia del SIR pulmonar. El PCI indujo un aumento de expresión de la proteína Bcl-2 a los 30 minutos de la reperusión, con respecto al grupo sometido a IR. Además, como se ha descrito anteriormente, también se observa una disminución de tinción para caspasa-9 en las células, con lo que se concluye que el PCI ejerce un efecto

protector sobre el SIR pulmonar, mediante la reducción de la apoptosis en los tejidos preconditionados.

Uno de los mecanismos que diferentes autores proponen para la protección del PCI sobre el daño por IR, es una elevación de la proteína Bcl-2, que protege la membrana mitocondrial de su permeabilización y evita la liberación de citocromo C y caspasa-9 al citosol, lo que ha demostrado disminuir la muerte celular tras la reperusión (108). Este mecanismo se ha demostrado en PCI en distintos órganos, como riñón (109,110), miocardio (111,112) y pulmón, entre otros.

Yang et al, demostraron mediante IHQ en pacientes sometidos a neumonectomía, que el PCI produce una elevación de células pulmonares teñidas con Bcl-2 mediante IHQ a los 30 y 60 minutos tras la reperusión, y demostraron, mediante el método de TUNEL, una reducción de la apoptosis, por lo que proponen una sobrerregulación de esta proteína como mecanismo protector precoz de la apoptosis y del daño por pulmonar causado por IR (73). Estos resultados y conclusiones están en concordancia con los de nuestro estudio. Sin embargo, en el experimento mencionado, no especifican qué tipo de células muestran expresión de Bcl-2, mientras que, en el presente trabajo, observamos en el estudio descriptivo, que tanto las células neumocitarias como de estirpe macrofágica parecen implicadas en esta protección.

Una de las limitaciones que tiene nuestro experimento es la complejidad en cuanto al modelo animal y a la dificultad de la técnica anestésica y quirúrgica, que por el contrario, hacen que se asemeje más a la realidad clínica con seres humanos. La brevedad del tiempo de reperusión de nuestro estudio también supone una limitación, ya que, aunque nuestro objetivo es analizar la modulación del PCI sobre la respuesta inflamatoria y apoptótica precoz en los tejidos, sería interesante poder evaluar la correspondencia con la evolución clínica de los animales a estudio.

El análisis de las tinciones inmunohistoquímicas se ha realizado mediante conteo de células fácilmente individualizables y con franca tinción, en zonas alveolares claras. Probablemente otro tipo de procesamiento de imagen más complejos nos hubieran permitido realizar un examen más exhaustivo y de zonas del tejido más difícilmente valorables, a pesar de ello, nuestros resultados han sido relevantes y el diseño es sencillo y fácilmente reproducible.

En resumen, hemos presentado un modelo experimental de autotrasplante pulmonar en cerdo, que demuestra la modulación de la fase temprana del SIR pulmonar, mediante PCI realizado mediante dos ciclos de 5 minutos de oclusión de la arteria pulmonar, con 5 minutos de reperusión entre ellos. La protección ejercida mediante el PCI, se manifiesta en los tejidos a los 30 minutos de la reperusión, tanto en el análisis histológico (tinción hematoxilina-eosina), como en las técnicas inmunohistoquímicas demostrando menor inflamación y

apoptosis. En el análisis histológico se demuestra una reducción del infiltrado inflamatorio de predominio macrofágico causado por IR pulmonar, que se confirma mediante IHQ por una disminución de células CD68+. además se demuestra una disminución de tinción para MCP-1, liberada por MA activados y neumocitos y que es responsable de la quimiotaxis de células de extirpe monocito-macrofágica, que posteriormente amplifican la respuesta inflamatoria. Además, el PCI ha mostrado una disminución de tinción IHQ para caspasa-9 y un aumento de expresión de la proteína antiapoptótica Bcl-2 en tejidos preconditionados, que se traduce como una disminución inminente de la apoptosis producida por la vía intrínseca y probablemente una protección mitocondrial.

A la vista de nuestros prometedores resultados, podemos concluir que el PCI directo sobre estructuras pulmonares, es una potente herramienta para prevenir el daño pulmonar por isquemia reperusión, que condiciona la morbimortalidad de numerosos procedimientos, cada vez más frecuentes en la actualidad. El PCI directo no ha supuesto en nuestro caso, un daño añadido al órgano, sino una protección. Por todo lo anterior, consideramos de gran interés científico la continuación de ésta línea de investigación, que en los últimos años ha perdido protagonismo, e investigar los efectos sinérgicos que podrían tener el PCI directo y remoto en la protección frente al SIR pulmonar.

CONCLUSIONES

1. En el presente modelo experimental de isquemia-reperfusión pulmonar, a los 30 minutos de la perfusión se observa un significativo grado de inflamación pulmonar y, más específicamente, de la infiltración del tejido pulmonar por monocitos y macrófagos, efectos que fueron atenuados cuando se realizó preconditionamiento isquémico directo sobre el pulmón.
2. El estudio inmunohistoquímico de la expresión de CD68 muestra un significativo aumento de la infiltración del tejido pulmonar por monocitos/macrófagos, y que el preconditionamiento isquémico reduce el grado de esta infiltración.
3. El estudio inmunohistoquímico de la expresión de MCP-1 muestra un significativo aumento de células neumocitarias y monocíticas que expresan esta quimioquina, mientras que en los pulmones sometidos a preconditionamiento isquémico esta expresión fue menor.
4. El preconditionamiento isquémico pulmonar parece proteger, mediante disminución de la activación de la proteína proapoptótica caspasa-9 y la activación proteína antiapoptótica Bcl-2, de la apoptosis inducida por isquemia-reperfusión pulmonar.

BIBLIOGRAFÍA

1. Haimovici H. Muscular, renal, and metabolic complications of acute arterial occlusions: myonephropathic-metabolic syndrome.. Vol. 85. Surgery; 1979 Apr pp. 461–8.
2. Parks DA, Granger DN. Contributions of ischemia and reperfusion to mucosal lesion formation. *Am J Physiol.* 1986 Jun;250(6 Pt 1):G749–53.
3. Collard CD, Gelman S. Pathophysiology, clinical manifestations, and prevention of ischemia-reperfusion injury. *Anesthesiology*; 2001.
4. Collard CD, Gelman S. Pathophysiology, clinical manifestations, and prevention of ischemia-reperfusion injury. *Anesthesiology.* 2001 Jun;94(6):1133–8.
5. Peng C-K, Huang K-L, Wu C-P, Li M-H, Hu Y-T, Hsu C-W, et al. Glutamine protects ischemia-reperfusion induced acute lung injury in isolated rat lungs. *Pulm Pharmacol Ther.* 2011 Feb;24(1):153–61.
6. King RC, Binns OA, Rodriguez F, Kanithanon RC, Daniel TM, Spotnitz WD, et al. Reperfusion injury significantly impacts clinical outcome after pulmonary transplantation. *Ann Thorac Surg.* 2000 Jun;69(6):1681–5.
7. de Perrot M. Ischemia-Reperfusion-induced Lung Injury. *Am J Respir Crit Care Med.* 2003 Feb 15;167(4):490–511.
8. Sharma AK, Lau CL, Stone ML, Laubach VE. Pulmonary Transplantation and Ischemia-Reperfusion Injury. 2012. *Topics in Thoracic Surgery* .Prof. Paulo Cardoso (Ed), Chapter 22. ISBN: 978-953-51-0010-2, InTech.
9. Espinosa M, Rodil R, Goikoetxea MJ. Trasplante pulmonar. *Anales del Sistema Sanitario Navarro* 2006. Vol 29. Suplemento 2.
10. Van Bilsen M, van der Vusse GJ, Coumans WA, de Groot MJ, Willemsen PH, Reneman RS. Degradation of adenine nucleotides in ischemic and reperfused rat heart. *Am J Physiol.* 1989 Jul;257(1 Pt 2):H47–54.
11. Hengst den WA, Gielis JF, Lin JY, Van Schil PE, De Windt LJ, Moens AL. Lung ischemia-reperfusion injury: a molecular and clinical view on a complex pathophysiological process. *AJP: Heart and Circulatory Physiology.* 2010 Oct 29;299(5):H1283–99.
12. Ovechkin AV, Lominadze D, Sedoris KC, Robinson TW, Tyagi SC, Roberts AM. Lung ischemia–reperfusion injury: implications of oxidative stress and platelet–arteriolar wall interactions. *Archives of Physiology and Biochemistry.* 2007 Jan;113(1):1–12.

13. LAUBACH VE, Sharma AK. Mechanisms of lung ischemia-reperfusion injury. *Curr Opin Organ Transplant*. 2016 Mar 3;21(3):246–52.
14. Fiser SM, Tribble CG, Long SM, Kaza AK, Cope JT, LAUBACH VE, et al. Lung transplant reperfusion injury involves pulmonary macrophages and circulating leukocytes in a biphasic response. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*. 2001 Jun;121(6):1069–75.
15. Eppinger MJ, Deeb GM, Bolling SF, Ward PA. Mediators of ischemia-reperfusion injury of rat lung. *Am J Pathol*. 1997 May;150(5):1773–84.
16. Sharma AK, Fernandez LG, Awad AS, Kron IL, Laubach VE. Proinflammatory response of alveolar epithelial cells is enhanced by alveolar macrophage-produced TNF- during pulmonary ischemia-reperfusion injury. *AJP: Lung Cellular and Molecular Physiology*. 2007 Apr 6;293(1):L105–13.
17. Aggarwal NR, King LS, D'Alessio FR. Diverse macrophage populations mediate acute lung inflammation and resolution. *AJP: Lung Cellular and Molecular Physiology*. American Physiological Society; 2014 Apr 15;306(8):L709–25.
18. Song J-X, Dian Z-J, Wen Y, Mei F, Li R-W, Sa Y-L. Assessment of the Number and Phenotype of Macrophages in the Human BMB Samples of CML. *Biomed Res Int*. Hindawi Publishing Corporation; 2016;2016:8086398–9.
19. Pedreira PR, García-Prieto E, Albaiceta GM, Taboada F. Respuesta inflamatoria y apoptosis en la lesión pulmonar aguda. *Medicina Intensiva*. Elsevier España, S.L; 2006;30(6):268–75.
20. Sharma AK, Fernandez LG, Awad AS, Kron IL, Laubach VE. Proinflammatory response of alveolar epithelial cells is enhanced by alveolar macrophage-produced TNF- during pulmonary ischemia-reperfusion injury. *AJP: Lung Cellular and Molecular Physiology*. 2007 Apr 6;293(1):L105–13.
21. Ng CSH, Wan S, Arifi AA, Yim APC. Inflammatory Response to Pulmonary Ischemia-Reperfusion Injury. *Surg Today*. 2006 Feb 24;36(3):205–14.
22. Fiser SM, Tribble CG, Long SM, Kaza AK, Cope JT, LAUBACH VE, et al. Lung transplant reperfusion injury involves pulmonary macrophages and circulating leukocytes in a biphasic response. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*. Elsevier; 2001 Jun;121(6):1069–75.
23. Mal H, Dehoux M, Sleiman C, Boczkowski J, Leseche G, Pariente R, et

- al. Early Release of Proinflammatory Cytokines After Lung Transplantation. *Chest*. 1998 Mar 1;113(3):645–51.
24. Hengst den WA, Gielis JF, Lin JY, Van Schil PE, De Windt LJ, Moens AL. Lung ischemia-reperfusion injury: a molecular and clinical view on a complex pathophysiological process. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2010 Oct 29;299(5):H1283–99.
25. Arias-Díaz J, Vara E, García C, Gómez M, Balibrea JL. Tumour necrosis factor-alpha inhibits synthesis of surfactant by isolated human type II pneumocytes. *Eur J Surg*. 1993 Oct;159(10):541–9.
26. Krishnadasan B, Naidu BV, Byrne K, Fraga C, Verrier ED, Mulligan MS. The role of proinflammatory cytokines in lung ischemia-reperfusion injury. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*. 2003 Feb;125(2):261–72.
27. Novick RJ, Gehman KE, Ali IS, Lee J. Lung preservation: the importance of endothelial and alveolar type II cell integrity. *Ann Thorac Surg*. 1996 Jul;62(1):302–14.
28. Deshmane SL, Kremlev S, Amini S, Sawaya BE. Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1): An Overview. *Journal of Interferon & Cytokine Research*. 2009 Jun;29(6):313–26.
29. Ward PA. Oxygen radicals, cytokines, adhesion molecules, and lung injury. *Environ Health Perspect*. 1994 Dec;102 Suppl 10:13–6.
30. Stammberger U, Gaspert A, Hillinger S, Vogt P, Odermatt B, Weder W, et al. Apoptosis induced by ischemia and reperfusion in experimental lung transplantation. *Ann Thorac Surg*. 2000 May;69(5):1532–6.
31. Ng CSH. Pulmonary ischaemia-reperfusion injury: role of apoptosis. *European Respiratory Journal*. 2005 Feb 1;25(2):356–63.
32. Tang PS, Mura M, Seth R, Liu M. Acute lung injury and cell death: how many ways can cells die? *AJP: Lung Cellular and Molecular Physiology*. 2008 Feb 29;294(4):L632–41.
33. Ng CSH, Wan S, Arifi AA, Yim APC. Inflammatory Response to Pulmonary Ischemia-Reperfusion Injury. *Surg Today*. 2006 Feb 24;36(3):205–14.
34. Elinos-Báez C, Maldonado V, Meléndez-Zajgla J. Caspasas: moléculas inductoras de apoptosis. *Gac Méd Méx*. 2003.
35. Jordán J. Apoptosis: muerte celular programada. *Offarm*. 2003.
36. Wolfs TGAM, de Vries B, Walter SJ, Peutz-Kootstra CJ, van Heurn LWE,

- Oosterhof GON, et al. Apoptotic Cell Death Is Initiated During Normothermic Ischemia in Human Kidneys. *Am J Transplant.* Munksgaard International Publishers; 2005 Jan;5(1):68–75.
37. Tang PS, Mura M, Seth R, Liu M. Acute lung injury and cell death: how many ways can cells die? *AJP: Lung Cellular and Molecular Physiology.* 2008 Feb 29;294(4):L632–41.
 38. Tang PS, Mura M, Seth R, Liu M. Acute lung injury and cell death: how many ways can cells die? *AJP: Lung Cellular and Molecular Physiology.* 2008 Feb 29;294(4):L632–41.
 39. Zhang X, Shan P, Alam J, Davis RJ, Flavell RA, Lee PJ. Carbon monoxide modulates Fas/Fas ligand, caspases, and Bcl-2 family proteins via the p38alpha mitogen-activated protein kinase pathway during ischemia-reperfusion lung injury. *J Biol Chem.* 2003 Jun 13;278(24):22061–70.
 40. Cao Q-F, Qu M-J, Yang W-Q, Wang D-P, Zhang M-H, Di S-B. Ischemia postconditioning preventing lung ischemia-reperfusion injury. *Gene.* 2015 Jan 1;554(1):120–4.
 41. Quadri SM, Segall L, de Perrot M, Han B, Edwards V, Jones N, et al. Caspase Inhibition Improves Ischemia-Reperfusion Injury After Lung Transplantation. *Am J Transplant.* 2005 Feb;5(2):292–9.
 42. Kirino T. Ischemic tolerance. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2002 Nov;22(11):1283–96.
 43. Peralta C, Prats N, Xaus C, Gelpí E, Roselló-Catafau J. Protective effect of liver ischemic preconditioning on liver and lung injury induced by hepatic ischemia-reperfusion in the rat. *Hepatology.* 1999 Dec;30(6):1481–9.
 44. Hengst den WA, Gielis JF, Lin JY, Van Schil PE, De Windt LJ, Moens AL. Lung ischemia-reperfusion injury: a molecular and clinical view on a complex pathophysiological process. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2010 Oct 29;299(5):H1283–99.
 45. de Perrot M, Liu M, Waddell TK, Keshavjee S. Ischemia–Reperfusion–induced Lung Injury. *Am J Respir Crit Care Med.* 2003 Feb 15;167(4):490–511.
 46. Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation.* 1986 Nov 1;74(5):1124–36.
 47. Veighey K, MacAllister RJ. Clinical Applications of Remote Ischemic Preconditioning. *Cardiology Research and Practice.* 2012;2012:1–9.

48. Clavien PA, Yadav S, Sindram D, Bentley RC. Protective effects of ischemic preconditioning for liver resection performed under inflow occlusion in humans. *Ann Surg*. 2000 Aug;232(2):155–62.
49. Wegener S. Transient Ischemic Attacks Before Ischemic Stroke: Preconditioning the Human Brain?: A Multicenter Magnetic Resonance Imaging Study. *Stroke*. 2004 Feb 12;35(3):616–21.
50. maisuyama K. Effect of spinal cord preconditioning on paraplegia during cross-clamping of the thoracic aorta.. Vol. 63. *Ann Thorac Surg*; 2012 Sep pp. 1305–20.
51. Fuller T, Freise C. Ischemic preconditioning improves rat kidney graft function after severe ischemia/reperfusion injury.. Vol. 37. *Transplant Proc*; 2005 Jan pp. 377–8.
52. Harkin DW, Barros D'Sa AAB, McCallion K, Hoper M, Campbell FC. Ischemic preconditioning before lower limb ischemia—reperfusion protects against acute lung injury. *Journal of Vascular Surgery*. 2002 Jun;35(6):1264–73.
53. Pasupathy S, Homer-Vanniasinkam S. Ischaemic Preconditioning Protects Against Ischaemia/Reperfusion Injury: Emerging Concepts. *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery*. 2005 Feb;29(2):106–15.
54. Zaugg M. Myocardial injury and its prevention in the perioperative setting. *British Journal of Anaesthesia*. 2004 Jul 1;93(1):21–33.
55. Luh S-P, Yang P-C. Organ preconditioning: the past, current status, and related lung studies. *J Zhejiang Univ Sci B*. 2006 May;7(5):331–41.
56. Thuret R, Saint Yves T, Tillou X, Chatauret N, Thuillier R, Barrou B, et al. Ischemic pre- and post-conditioning: current clinical applications. *Progrès en Urologie - FMC*. Elsevier; 2014 Jun 1;24(S1):S56–S61.
57. Pasupathy S, Homer-Vanniasinkam S. Ischaemic Preconditioning Protects Against Ischaemia/Reperfusion Injury: Emerging Concepts. *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery*. Elsevier; 2005 Feb;29(2):106–15.
58. Bolli R. The Late Phase of Preconditioning. *Circulation Research*. 2000 Nov 24;87(11):972–83.
59. Soncul H, Öz E, Kalaycioglu S. Role of Ischemic Preconditioning on Ischemia-Reperfusion Injury of the Lung*. *Chest*. American College of Chest Physicians; 1999;115(6):1672–7.

60. Simon C, Vara E, Garutti I, Gonzalez-Casaurran G, Azcarate L, Isea J, et al. Modulation of monocyte chemoattractant protein-1 expression by ischaemic preconditioning in a lung autotransplant model. *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery*. 2011 Nov 16.
61. Pasupathy S, Homer-Vanniasinkam S. Ischaemic Preconditioning Protects Against Ischaemia/Reperfusion Injury: Emerging Concepts. *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery*. Elsevier; 2005 Feb;29(2):106–15.
62. Przyklenk K, Bauer PB, Ovize MM, Kloner MRA, MD, PhD, et al. regional ischemic preconditioning protects remote virgin myocardium from subsequent sustained coronary occlusion. *Circulation*. 1993 Mar 5;87(3):1–8893–899.
63. Przyklenk K, Whittaker P. Remote ischemic preconditioning: current knowledge, unresolved questions, and future priorities. *Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics*. SAGE Publications; 2011 Sep;16(3-4):255–9.
64. Gasparria RI, Jannisa NC, Flamengo WJ, Lerutb TE, Dirk EM Van Raemdoncka. Ischemic preconditioning enhances donor lung preservation in the rabbitq. *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery*. 1999 Nov 30;(16):639±646.
65. Li G, Chen S, Lu E, Hu T. Protective effects of ischemic preconditioning on lung ischemia reperfusion injury: an in-vivo rabbit study.. Vol. 47. *thoracic cardiovascular surgery*; 1999 May pp. 38–41.
66. Li G, Chen S, Lou W, Lu E. Protective effects of ischemic preconditioning on donor lung in canine lung transplantation. *Chest*. 1998 May;113(5):1356–9.
67. Friedrich I, Spillner J, Lu EX, Bartling B, Barnscheid M, Sablotzki A, et al. Ischemic pre-conditioning of 5 minutes but not of 10 minutes improves lung function after warm ischemia in a canine model. *J Heart Lung Transplant*. Elsevier; 2001;20(9):985–95.
68. Du ZY, Hicks M, Winlaw D, Spratt P, Macdonald P. Ischemic preconditioning enhances donor lung preservation in the rat. *J Heart Lung Transplant*. 1996 Dec;15(12):1258–67.
69. Pilla ES, Vendrame GS, Sánchez PG, Grun G, Fontena E, Forgiarini LA, et al. Ischemic preconditioning by selective occlusion of the pulmonary artery in rats. *J Bras Pneumol*. 2008 Aug;34(8):583–9.
70. Yildiz G, Demiryürek AT, Gümüşel B, Lipton H. Ischemic preconditioning modulates ischemia-reperfusion injury in the rat lung: role of adenosine receptors. *Eur J Pharmacol*. 2007 Feb 5;556(1-

3):144–50.

71. Jun PN, Ke MJ, Gang PC, Lin MC, Jinsong ML, Jianjun MW. The Protective Effect of Ischemic Preconditioning Associated with Altered Gene Expression Profiles in Rat Lung after Reperfusion. *YJSRE*. Elsevier Ltd; 2011 Jun 15;168(2):281–93.
72. Featherstone RL, Chambers DJ, Kelly FJ. Ischemic preconditioning enhances recovery of isolated rat lungs after hypothermic preservation. *Ann Thorac Surg*. Elsevier; 2000;69(1):237–42.
73. Yang Y, Chen S, Zhang W. [Effect of ischemic preconditioning on human lung cell apoptosis in vivo and the expression of regulating gene bcl-2]. *Hunan Yi Ke Da Xue Xue Bao*. 2002 Mar 19;27(1):43–5.
74. Chen S, Li G, Long L. Clinical research of ischemic preconditioning on lung protection. Vol. 24. *Hunan Yi Ke Da Xue Xue Bao*; 1999 May pp. 357–9.
75. Yamazaki F, Wada H, Aoki M, Inui K, Hitomi S. An evaluation of the tolerance of the autotransplanted canine lung against warm ischemia. *Jpn J Surg*. 1989 May;19(3):326–33.
76. Van Raemdonck DE, Jannis NC, De Leyn PR, Flameng WJ, Lerut TE. Warm ischemic tolerance in collapsed pulmonary grafts is limited to 1 hour. *Ann Surg*. 1998 Dec;228(6):788–96.
77. Adiego CS, González-Casaurrán G, Perea LA, Viña JI, Ameigeiras EV, Martín CG, et al. Procedimiento de autotrasplante pulmonar en el cerdo como modelo experimental para el estudio del síndrome de isquemia-reperfusión. *Archivos de Bronconeumología*. SEPAR; 2011 Apr 11;47(6):1–7.
78. SIMÓN C, Vara E, Garutti I, González-Casaurrán G, Azcarate L, Isea J, et al. Modulation of monocyte chemoattractant protein-1 expression by ischaemic preconditioning in a lung autotransplant model. *Eur J Cardiothorac Surg*. Oxford University Press; 2012 Apr;41(4):933–9.
79. Zhang CF, Chen SX, Guo HZ, Luo WJ. [Protective mechanism of ischemic preconditioning to the lung ischemia-reperfusion injury]. *Zhong nan da xue xue bao* 2005.
80. Zhang C, Guo Z, Liu H, Shi Y, Ge S. Influence of levosimendan postconditioning on apoptosis of rat lung cells in a model of ischemia-reperfusion injury. *PLoS ONE*. 2015;10(1):e0114963.
81. Zhang H, Cui Z, Luo G, Zhang J, Ma T, Hu N, et al. Ghrelin attenuates intestinal ischemia/reperfusion injury in mice by activating the mTOR signaling pathway. *Int J Mol Med*. 2013 Oct;32(4):851–9.

82. Meng C, Ma L, Liu J, Cui X, Liu R, Xing J, et al. Inflation with carbon monoxide in rat donor lung during cold ischemia phase ameliorates graft injury. *Exp Biol Med* (Maywood). 2016 Feb;241(3):246–54.
83. Rodríguez NS, Barrasa J, González M. Valoración de la lesión de isquemia-reperfusión y del rechazo agudo precoz en el trasplante pulmonar experimental con tiempo de isquemia prolongado. *Archivos de ...* 2007;43(7):373–7.
84. HUGGINS CE. Reimplantation of lobes of the lung. An experimental technique. *The Lancet*. 1959 Dec 12;2(7111):1059–62.
85. Davies LG, Rosser TH, West LR. Autotransplantation of the lung in sheep. *Thorax*. 1965 Nov;20(6):481–94.
86. Simón Adiego C, González-Casaurrán G, Azcárate Perea L, Isea Viña J, Vara Ameigeiras E, García Martín C, et al. Procedimiento de autotrasplante pulmonar en el cerdo como modelo experimental para el estudio del síndrome de isquemia-reperfusión. *Archivos de Bronconeumología*. 2011 Jun;47(6):283–9.
87. Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation*. Lippincott Williams & Wilkins; 1986 Nov;74(5):1124–36.
88. Tapuria N, Kumar Y, Habib MM, Amara MA, Seifalian AM, Davidson BR. Remote Ischemic Preconditioning: A Novel Protective Method From Ischemia Reperfusion Injury—A Review. *YJSRE*. Elsevier Inc; 2008 Dec 1;150(2):304–30.
89. Li D-Y, Shi X-J, Li W, Sun X-D, Wang G-Y. Ischemic preconditioning and remote ischemic preconditioning provide combined protective effect against ischemia/reperfusion injury. *Life Sciences*. 2016 Apr 1;150:76–80.
90. Waldow T, Alexiou K, Witt W, Wagner FM, Guliernos V, Matschke K, et al. Attenuation of Reperfusion-Induced Systemic Inflammation by Preconditioning With Nitric Oxide in an In Situ Porcine Model of Normothermic Lung Ischemia*. *Chest*. American College of Chest Physicians; 2004;125(6):2253–9.
91. Prakash A, Mesa KR, Wilhelmsen K, Xu F, Dodd-o JM, Hellman J. Alveolar macrophages and Toll-like receptor 4 mediate ventilated lung ischemia reperfusion injury in mice. *Anesthesiology*. 2012 Oct;117(4):822–35.
92. Zhao M, Fernandez LG, Doctor A, Sharma AK, Zarbock A, Tribble CG, et al. Alveolar macrophage activation is a key initiation signal for acute lung ischemia-reperfusion injury. *AJP: Lung Cellular and Molecular*

Physiology. 2006 Jul 7;291(5):L1018–26.

93. Naidu BV, Fraga C, Salzman AL, Szabo C, Verrier ED, Mulligan MS. Critical role of reactive nitrogen species in lung ischemia-reperfusion injury. *J Heart Lung Transplant*. 2003 Jul;22(7):784–93.
94. Fuertes L, Santonja C, Kutzner H, Requena L. Inmunohistoquímica en dermatopatología: revisión de los anticuerpos utilizados con mayor frecuencia (parte ii). *Actas Dermo-Sifiliográficas*. 2013 Apr;104(3):181–203.
95. Thenappan T, Goel A, Marsboom G, Fang Y-H, Toth PT, Zhang HJ, et al. A central role for CD68(+) macrophages in hepatopulmonary syndrome. Reversal by macrophage depletion. *Am J Respir Crit Care Med*. 2011 Apr 15;183(8):1080–91.
96. Akbarshahi H, Menzel M, Posaric Bauden M, Rosendahl A, Andersson R. Enrichment of murine CD68+ CCR2+ and CD68+ CD206+ lung macrophages in acute pancreatitis-associated acute lung injury. *PLoS ONE*. 2012;7(10):e42654.
97. Sun C-K, Leu S, Hsu S-Y, Zhen Y-Y, Chang L-T, Tsai C-Y, et al. Mixed serum-deprived and normal adipose-derived mesenchymal stem cells against acute lung ischemia-reperfusion injury in rats. *Am J Transl Res*. 2015;7(2):209–31.
98. Zaynagetdinov R, Sherrill TP, Kendall PL, Segal BH, Weller KP, Tighe RM, et al. Identification of myeloid cell subsets in murine lungs using flow cytometry. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2013 Aug;49(2):180–9.
99. Matsuo S, Saiki Y, Adachi O, Kawamoto S, Fukushige S, Horii A, et al. Single-dose rosuvastatin ameliorates lung ischemia-reperfusion injury via upregulation of endothelial nitric oxide synthase and inhibition of macrophage infiltration in rats with pulmonary hypertension. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*. Elsevier; 2015 Mar;149(3):902–9.
100. Jang J-H, Yamada Y, Janker F, De Meester I, Baerts L, Vliegen G, et al. Anti-inflammatory effects on ischemia/reperfusion-injured lung transplants by the cluster of differentiation 26/dipeptidylpeptidase 4 (CD26/DPP4) inhibitor vildagliptin. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*. Elsevier; 2016 Nov 15;0(0).
101. An S, Hishikawa Y, Liu J, Koji T. Lung injury after ischemia-reperfusion of small intestine in rats involves apoptosis of type II alveolar epithelial cells mediated by TNF-alpha and activation of Bid pathway. *Apoptosis*. 2007 Nov;12(11):1989–2001.
102. Quadri SM, Segall L, de Perrot M, Han B, Edwards V, Jones N, et al.

Caspase inhibition improves ischemia-reperfusion injury after lung transplantation. *Am J Transplant*. 2005 Feb;5(2):292–9.

103. Hirata T, Fukuse T, Hanaoka S, Matsumoto S, Chen Q, Wada H. Mitochondrial respiration as an early marker of viability in cardiac-arrested rat lungs. *YJSRE*. 2001 Apr;96(2):268–76.
104. Fujinaga T, Nakamura T, Fukuse T, Chen F, Zhang J, Ueda S, et al. Isoflurane inhalation after circulatory arrest protects against warm ischemia reperfusion injury of the lungs. *Transplantation*. 2006 Nov 15;82(9):1168–74.
105. Potokar M, Milisav I, Kreft M, Stenovec M, Zorec R. Apoptosis triggered redistribution of caspase-9 from cytoplasm to mitochondria. *FEBS Lett*. 2003 Jun 5;544(1-3):153–9.
106. Ritter PM, Marti A, Blanc C, Baltzer A. Nuclear localization of procaspase-9 and processing by a caspase-3-like activity in mammary epithelial cells. *European journal of cell Biology*. May 2000;79(5):358–64.
107. Cooke DT, Hoyt EG, Robbins RC. Overexpression of human Bcl-2 in syngeneic rat donor lungs preserves posttransplant function and reduces intragraft caspase activity and interleukin-1 β production. *Transplantation*. 2005.
108. Pac-Soo CK, Mathew H, Ma D. Ischaemic conditioning strategies reduce ischaemia/reperfusion-induced organ injury. *British Journal of Anaesthesia*. Oxford University Press; 2015 Feb 1;114(2):204–16.
109. Wu H-H, Hsiao T-Y, Chien C-T, Lai M-K. Ischemic conditioning by short periods of reperfusion attenuates renal ischemia/reperfusion induced apoptosis and autophagy in the rat. *J Biomed Sci*. 2009;16(1):19.
110. Yousefi H, Ahmadiasl N, Alihemmati A, Habibi P. Effect of renal ischemia-reperfusion on lung injury and inflammatory responses in male rat. *Iran J Basic Med Sci*. 2014 Oct;17(10):802–7.
111. Lazou A, Iliodromitis EK, Cieslak D, Voskarides K, Mousikos S, Bofilis E, et al. Ischemic but not mechanical preconditioning attenuates ischemia/reperfusion induced myocardial apoptosis in anaesthetized rabbits: The role of Bcl-2 family proteins and ERK1/2. *Apoptosis*. Kluwer Academic Publishers; 2006 Oct 17;11(12):2195–204.
112. Maulik N, Engelman RM, Rousou JA, Flack JE, Deaton D, Das DK. Ischemic preconditioning reduces apoptosis by upregulating anti-death gene Bcl-2. *Circulation*. Am Heart Assoc; 1999;100(suppl 2):II-369–II-375.

